

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN PROTECCIÓN VEGETAL

**DETERMINACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y
PATOGENICA DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA
MARCHITEZ Y MUERTE DEL DURAZNERO**

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

EVARISTO SÁNCHEZ TRUJILLO

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2008



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

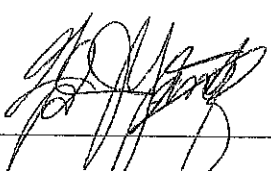


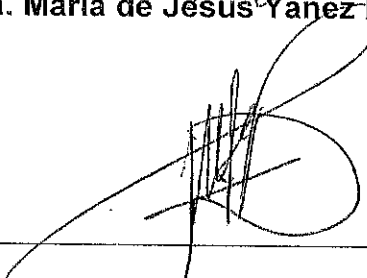
**DETERMINACIÓN MORFOLOGICA, MOLECULAR Y PATOGENICA DE LOS
AGENTES CAUSALES DE LA MARCHITEZ Y MUERTE DEL DURAZNERO**

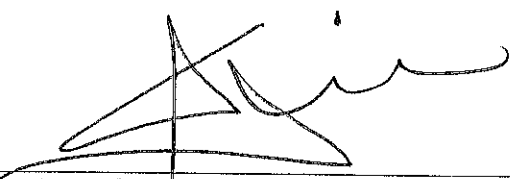
Tesis realizada por el **Ing. Evaristo Sánchez Trujillo**, bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada y aceptada por el mismo como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: 
Dr. Marcelo Acosta Ramos

CODIRECTOR: 
Dra. María de Jesús Yáñez Morales

ASESOR: 
MC. Francisco Ponce González

ASESOR: 
Dr. Víctor Manuel Pinto

Chapingo, Estado de México. Junio, 2008.

AGRADECIMIENTOS

(Dando gracias siempre en todo al Dios y Padre...Efesios 5:20)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por financiar mis estudios de maestría.

A mi *alma mater*, la Universidad Autónoma Chapingo, por darme la oportunidad de lograr una meta más.

Al Departamento de Parasitología Agrícola y su Programa de Estudios de Postgrado en Protección Vegetal, por los conocimientos compartidos a través de sus profesores e incentivar me en el área de la fitosanidad.

A mi Comité Asesor: Dr. Marcelo Acosta Ramos, por su amistad, apoyo y ejemplo de dedicación al trabajo y desarrollo personal. Dra. María de Jesús Yáñez Morales, por compartir sus conocimientos, disciplina y gusto por el trabajo con hongos fitopatógenos. Al MC. Francisco Ponce González, por inducir me a la realización de este trabajo de investigación.

Al MC. Luis Emilio Castillo Márquez, por su asesoría en el análisis estadístico.

Al Prof. Guadalupe Anzures, de Ocuituco, Morelos, y el amigo Exaú, por su interés y apoyo en el trabajo de campo.

A Ángeles y Armando, porque no dejaron pasar la oportunidad de apoyarme a culminar este trabajo.

A mis compañeros y amigos de la generación 37 (omito los nombres porque todos están en primer orden y esto no es posible escribirlo), gracias por hacer amena mi estancia en la maestría.

DEDICATORIA

**A los productores de durazno del estado de Morelos,
especialmente a la Sociedad Cooperativa Frutas Finas de
Morelos (FRUFIMOR)**

DATOS BIOGRÁFICOS

Evaristo Sánchez Trujillo nació el 25 de noviembre de 1974 en Cosolapa, Oaxaca. Los estudios de primaria y secundaria los realizó en el municipio de Hueyapan de Ocampo, Veracruz. De 1992 a 1995 cursó la Preparatoria Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo, donde también concluyó la carrera de Ing. Agrónomo Especialista en Zonas Tropicales de 1995 a 1999, siendo parte de la primera generación de la especialidad.

Del 2000 al 2005 laboró con grupos de productores como asesor técnico en cultivos de básicos, hortalizas y frutales, en el sector empresarial y el Instituto Veracruzano para el Desarrollo Rural.

Del 2005 al 2007 realizó sus estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Actualmente labora en la Dirección General de Inspección Fitozoosanitaria.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
HIPÓTESIS.....	3
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1. EL CULTIVO DEL DURAZNERO.....	4
1.1.1. Origen.....	4
1.1.2. Clasificación taxonómica.....	5
1.1.3. Características botánicas.....	5
1.1.4. Requerimientos edáficos y climáticos.....	8
1.1.5. Periodos anuales de vegetación.....	8
1.1.6. Importancia mundial del durazno.....	9
1.1.7. Importancia en México.....	10
1.1.8. Importancia en el estado de Morelos.....	12
1.1.9. Forma de cultivo en México.....	12
1.2. ENFERMEDADES FUNGOSAS DEL DURAZNERO.....	15
1.2.1. Enfermedades del cuello y raíz.....	17
1.2.1.1. Podrición texana por <i>Phymatotrichopsis omnivora</i> ..	17
1.2.1.2. Podrición de la raíz y de la corona por <i>Armillaria mellea</i>	18
1.2.1.3. Podrición de la raíz y corona por <i>Phytophthora</i> spp.....	19
1.2.1.4. Marchitez por <i>Verticillium</i> spp.....	21
1.2.1.5. Podrición de la raíz <i>Rosellinia necatrix</i>	23
1.2.1.6. Podrición violeta de la raíz (<i>Helicobasidium mompa</i>	25

1.2.1.7.	Secazón o muerte repentina (complejo <i>Phytophthora cinnamomi</i> , <i>Pythium</i> sp. y <i>Fusarium</i>)	26
1.2.1.8.	<i>Fusarium</i> spp. en durazno.....	27
1.2.1.9.	<i>Fusarium</i> spp. en otros frutales de hueso.....	31
1.2.1.10.	<i>Gliocladium</i> spp.....	31
1.3.	CARATERIZACIÓN MOLECULAR.....	32
1.4.	CONDICIONES CLIMATOLÓGICAS Y SUELO EN LA REGIÓN DE ESTUDIO.....	33
1.5.	LITERATURA CITADA.....	35
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS AISLADOS DE DURAZNERO EN EL ESTADO DE MORELOS.....		46
2.1.	INTRODUCCION.....	46
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
	FASE DE CAMPO.....	46
2.2.1.	Localización del área de estudio.....	46
2.2.2.	Sitios de muestreo.....	48
2.2.3.	Características de los huertos seleccionados.....	48
2.2.4.	Fechas de muestreo.....	48
2.2.5.	Evaluación de la incidencia.....	48
2.2.6.	Colecta y manejo de muestras vegetales.....	49
	FASE DE LABORATORIO.....	51
2.2.7.	Preparación del material vegetal.....	52
2.2.8.	Aislamiento de hongos.....	53
2.2.9.	Purificación de hongos aislados.....	54
2.2.10.	Conservación de colonias.....	55
2.2.11.	Identificación morfológica.....	55
2.2.12.	Caracterización molecular.....	56
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
	FASE DE CAMPO.....	58
2.3.1	Características de los huertos seleccionados.....	58
2.3.2.	Fechas de muestreo.....	62
2.3.3	Evaluación de la incidencia.....	62
2.3.3.1.	Incidencia.....	62

2.3.3.2. Síntomas de la enfermedad.....	64
FASE DE LABORATORIO.....	77
2.3.4. Preparación del material vegetal.....	77
2.3.5. Aislamiento de patógenos.....	77
2.3.6. Identificación morfológica.....	81
2.3.7. Identificación molecular.....	87
2.4 CONCLUSIONES.....	92
2.5 LITERATURA CITADA.....	93
CAPÍTULO III. AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO, RAMAS, AMARILLAMIENTO, MARCHITEZ Y MUERTE DE ÁRBOLES DE DURAZNO DE 1.5 AÑOS.....	99
3.1. INTRODUCCIÓN.....	99
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
3.2.1. Preparación del material vegetal.....	99
3.2.2. Preparación del inóculo.....	103
3.2.3. Inoculación.....	105
3.2.4. Evaluaciones de la parte aérea.....	109
3.2.4.1. Indicadores de crecimiento.....	111
3.2.4.2. Incidencia.....	111
3.2.4.3. Severidad.....	111
3.2.4.4. Datos climatológicos.....	112
3.2.5. Evaluaciones de la raíz.....	112
3.2.6. Identificación morfológica y molecular.....	114
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	115
3.3.1. Preparación del material vegetal.....	115
3.3.2. Preparación del inóculo.....	115
3.3.3. Inoculación.....	116
3.3.4. Evaluaciones de la parte aérea.....	117
3.3.4.1. Indicadores de crecimiento.....	117
3.3.4.2. Incidencia.....	120
3.3.4.3. Severidad.....	120
3.3.4.4. Síntomas.....	122
3.3.5. Datos climatológicos.....	133

3.3.6.	Evaluaciones de raíz.....	134
3.3.7.	Identificación morfológica.....	150
3.3.8.	Identificación molecular.....	150
3.4.	CONCLUSIONES.....	150
3.5.	LITERATURA CITADA	152
CAPÍTULO IV. AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO, RAMAS, AMARILLAMIENTO, MARCHITEZ Y MUERTE EN PLANTULAS DE CINCO MESES DE EDAD.....		155
4.1.	INTRODUCCIÓN.....	155
4.2.	MATERIALES Y METODOS.....	155
4.2.1.	Preparación del material vegetal.....	155
4.2.2.	Inoculación.....	157
4.2.3.	Reaislamiento.....	160
4.2.4.	Identificación morfológica y molecular.....	160
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	161
4.3.1.	Preparación del material vegetal.....	161
4.3.2.	Preparación del inóculo.....	161
4.3.3.	Inoculación.....	161
4.3.4.	Síntomas en el follaje.....	163
4.3.5.	Reaislamiento.....	166
4.3.6.	Identificación morfológica.....	174
4.3.7.	Identificación molecular.....	174
4.4.	CONCLUSIONES.....	175
4.5.	LITERATURA CITADA.....	176
ANEXOS.....		178

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
	CAPÍTULO I	
1.1.	Importancia mundial del durazno.....	10
1.2.	Importancia nacional del durazno.....	11
1.3.	Enfermedades fungosas en duraznero.....	16
1.4.	Especies de <i>Fusarium</i> reportadas en duraznero y otros frutales de hueso.....	28
1.5.	Promedios mensuales de temperatura y precipitación de la región de Estudio.....	34
	CAPÍTULO II	
2.1.	Fechas de colecta y tipo de muestra, en 13 huertos de los municipios de Tetela del Volcán y Ocuiluco, Morelos.....	50
2.2.	Condiciones de pH, materia orgánica y textura del suelo en huertos de Tetela del Volcán y Ocuiluco, Morelos.....	61
2.3.	Fertilidad del suelo en huertos de Tetela del Volcán y Ocuiluco, Morelos.....	61
2.4.	Incidencia de árboles enfermos en huertos de Ocuiluco y Tetela del Volcán...	64
2.5.	Tamaño de lesiones necróticas en tallos.....	70
2.6.	Lesiones necróticas en raíz con síntoma avanzado.....	74
2.7.	Pigmentación de las colonias aisladas de raíz, tallo, corona y tallo..	78
2.8.	Porcentaje de hongos aislados de muestras de árboles enfermos en huertos de dos municipios.....	80
2.9.	Características morfológicas de <i>Fusarium</i> spp.....	82
2.10.	Características morfológicas de <i>Verticillium</i> spp.....	85
2.11.	Características morfológicas de <i>Gliocladium</i> sp.....	86
2.12.	Caracterización molecular por PCR-ITS [®] de genes ribosomales rRNA de 24 hongos aislados de raíz, corona y tallo de árboles y plántulas de duraznero, y comparación de sus secuencias con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).....	91
	CAPÍTULO III	
3.1.	Tratamientos analizados con el paquete estadístico SAS®.....	110
3.2.	Variables de crecimiento promedio evaluadas en la inoculación de hongos aislados de duraznero (datos tomados de febrero a diciembre de 2007).....	119
3.3.	Porcentaje de incidencia y severidad en árboles de 1.5 años en promedios de 10 evaluaciones.....	121
3.4.	Condiciones de temperatura y humedad relativa promedio durante la prueba de patogenicidad en invernadero.....	134
3.5.	Afectación en el volumen de raíz en plantas inoculadas de 1.5 años de edad (5 meses después de la inoculación).....	135
3.6.	Cuantificación de necrosis en árboles de 1.5 años inoculados con diferentes aislamientos (evaluados 5 meses después de la inoculación).....	140
3.7.	Porcentaje de re-aislamiento de plantas de durazno de 1.5 años	

después de cinco meses de inoculadas con 13 aislamientos fungosos por tres métodos de inoculación.....	148
---	-----

CAPÍTULO IV

4.1. Cuantificación de necrosis en tallo y raíz de plántulas de 5 meses de edad. A los 15 después de inoculadas.....	167
4.2. Porcentaje de re-aislamiento en plántulas de durazno de 5 meses de edad inoculadas con cinco aislamientos fungosos, después de 15 días de inoculadas.....	171

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
CAPÍTULO I		
1.1.	Representación de la estructura de un árbol según Gil-Albert (1989).....	7
CAPÍTULO II		
2.1.	Localización geográfica de los municipios de Ocuituco y Tetela del Volcán, Morelos. Fuente: EMM, 2005; INEGI, 2005.....	47
2.2.	Toma de muestras de raíz principal y secundarias a diferentes profundidades. a) Raíces superficiales (0-15 cm), b) de 15-30 cm, y c) de 15 a 40 cm.....	49
2.3.	Toma de muestras de la corona y tallo. a) Corona, b) Tallo.....	50
2.4.	Muestras de: a) Raíz secundaria, b) corona, c) tallo.....	52
2.5.	Desinfestación y secado de cortes de raíz para aislamiento de hongos.....	53
2.6.	Siembra en cuatro diferentes medios de cultivo: a) PDA, b) PCA, c) V8 y d) EMA.....	53
2.7.	Conservación de cultivos monospóricos en ultra congelación....	55
2.8.	Inicial: a) Amarillamiento del follaje, b) apariencia de deficiencia nutricional.....	65
2.9.	Inicial: a) Árbol joven (4 años) con síntomas de decaimiento. b) Árbol en edad productiva con los mismos síntomas. Se observa el contraste con los sanos al fondo y la existencia de ramas aparentemente sanas.....	66
2.10.	Intermedio: Muerte apical, inicia con la marchites de las hojas más recientes (a), y posteriormente se seca toda la ramita (b)...	66
2.11.	Intermedio: Es común observar ramas muertas y aparentemente sanas en el mismo árbol, ya sea en: a) árboles jóvenes menores de 4 años, b) en plena producción (7años) y c), d) 10 años.....	67
2.12.	Avanzado: a) Follaje totalmente seco pero adherido al árbol. b) Enfermo en contraste con árboles sanos.....	67
2.13.	Daño avanzado: a) Frutos producidos en gran cantidad pero sin valor comercial. b) Frutos y follaje secos adheridos al árbol.....	68
2.14.	Iniciales: a) Necrosamiento inicial en el centro de una rama. b) Daño color café claro a oscuro conforme avanza el necrosamiento en el tallo.....	70
2.15.	Intermedio: a) Necrosamiento en el centro de las ramas, circulares, y de forma irregular en cortes transversales, b) La rama puede estar aún sin secarse y con follaje pero ya con síntomas al realizar un corte.....	71
2.16.	Intermedio: a) En cortes longitudinales se aprecia coloración café, b) café-rojizo en haces vasculares.....	71
2.17.	Avanzado: a) Necrosamiento generalizado, no solo en el centro sino en la mayor parte del tejido interno, b) el tallo completamente seco y con necrosis interna.....	71

2.18.	Presencia de gomosis de color ámbar a oscuro en ramas y troncos. a) En ramas de árboles con 7 años de edad; b) ramas de 10 años, c) canchales en tronco, de 15 años; d) tronco de 4 años.....	72
2.19.	Iniciales. Presencia de micelio blanquecino sobre la corteza de raíces.....	73
2.20.	Intermedio. Necrosis en el centro de las raíces secundarias. a) En corte longitudinal. b) En forma de círculo. C) De forma irregular. d) Se observan también en forma de anillos (necrosis en el periciclo).....	75
2.21.	Intermedio. Detalle de la necrosis en forma de manchas irregulares en el centro (parénquima cortical) de las raíces.....	75
2.22.	Iniciales. Necrosis en corona de árbol de 4 años.....	76
2.23.	Avanzados. a) Oscurecimiento, pudrición y presencia de micelio blanquecino, b) entre la corteza y la madera en la corona, en árboles de 10 -15 años de edad.	76
2.24.	Diferentes grupos de colonias por pigmentación y forma de crecimiento de <i>F. oxysporum</i> . a) blanco algodonoso regular, b) rosa algodonoso, c) rojo ladrillo inmerso en el medio, d) violeta inmerso en el medio, e) rosa pálido algodonoso, f) blanco-crema inmerso, g) púrpura algodonoso, h) crema inmerso y i) blanco algodonoso abundante.....	79
2.25.	<i>F. oxysporum</i> . a) Microconidios en falsas cabezas, b) detalle de la fiálide corta, c) macroconidio, d) clamidosporas solitarias o en pares. Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.....	83
2.26.	<i>F. solani</i> . a) Colonia con pigmentación naranja en los bordes, b) reverso de la caja Petri con medio EMA, c) microconidios en falsas cabezas, d), fiálide corta de <i>F. oxysporum</i> , e) y f) fialides largas de <i>F. solani</i> , g) macro y microconidio, h) clamidosporas. . Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.....	84
2.27.	<i>V. albo-atrum</i> . a) pigmentación blanca, colonia con 8 días de edad b) reverso de la caja petri, c) y d) fiálides y verticiladas y microconidios. Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.....	85
2.28.	a) <i>G. roseum</i> , pigmentación blanca-crema de frente y b) amarillo al reverso, c) dos tipos de codióforos, verticilados y penicililados, d) conidioforo tipo <i>Verticillium</i> , e) conidioforo tipo <i>Penicillium</i> , f) los conidios son alargados en ambos tipos de conidioforos. . Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.....	86
2.29.	<i>Dematophora</i> sp. a) Colonia color blanco, b) capa microesclerocial vista al reverso de la caja Petri, c) hinchamientos piriformes a nivel de los septos. Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X...	87
2.30.	Gel de agarosa de las bandas de ADN para los 13 aislamientos	

	obtenidos de árboles de campo. 1, 2, 3, 5, 9, 10, 11, 12 y 13= <i>F. oxysporum</i> . 4= <i>F. solani</i> . 6= <i>G. roseum</i> , 7= <i>V. albo-atrum</i> . 8= <i>Dematophora</i> sp.....	88
2.31.	Figura 2.31. Gel de agarosa de las bandas de ADN para los 11 aislamientos obtenidos de la prueba de patogenicidad con árboles de 1.5 años y plántulas de 5 meses (capítulos III y IV). 17, 19, 23, 24, 25, 26, 39, 40, y 46= <i>F. oxysporum</i> . 49= <i>F. solani</i> . Primera columna = marcador.....	88
2.32.	Figura 2.32. Gel de agarosa del producto de PCR, las bandas de las regiones ITS de 600 pares de bases. 1) <i>F. oxysporum</i> , 2) <i>F. oxysporum</i> , 3) <i>F. oxysporum</i> , 4) <i>F. solani</i> , 5) <i>F. oxysporum</i> , 6) <i>G. roseum</i> , 7) <i>V. albo-atrum</i> , 8) <i>Dematophora</i> sp. 9) <i>F. oxysporum</i> , 10) <i>F. oxysporum</i> , 11) <i>F. oxysporum</i> , 12) <i>F. oxysporum</i> , 13) <i>F. oxysporum</i> . Primera columna = marcador.....	89
2.33.	Figura 2.33. Gel de agarosa del producto de PCR, las bandas de las regiones ITS de 600 pares de bases. 17, 19, 23, 24, 25, 26, 39, 40, y 46= <i>F. oxysporum</i> . 49= <i>F. solani</i> . Primera columna = marcador.	90
	CAPITULO III	
3.1.	Plantas de 1.5 años antes de ser preparadas para la inoculación.....	100
3.2.	Mezcla utilizada para el cambio de sustrato.....	100
3.3.	Esterilización del sustrato con Metam Sodio.....	101
3.4.	Raíces sin desinfectar.....	101
3.5.	Desinfestación de raíces con hipoclorito de sodio al 1.5%. a) Eliminación del sustrato en agua corriente, b) preparación de la solución de hipoclorito de sodio y c) triple lavado con agua purificada.....	102
3.6.	Colocación de las plantas en bolsas nuevas. a) Raíces sin desinfectar, b) aspecto de las raíces después del proceso de desinfestación, c) colocación en la nueva bolsa y llenado con el sustrato desinfectado.....	102
3.7.	Plantas de 1.5 años después de cambiarles el sustrato por nuevo desinfestado, desinfectar la raíz, y podarlas.....	103
3.8.	Preparación del inóculo con semillas de mijo. a) Llenado de matraces para esterilización de la semilla, b) inoculación de la semilla esterilizada.....	104
3.9.	Preparación de las soluciones conidiales o propágulos.....	106
3.10.	a) Herida a la raíz y b) agregado de la solución conidial.....	106
3.11.	Heridas a la raíz con navaja.	107
3.12.	Detalle de la inoculación al tallo. a) Herida en la base, b) colocación de los discos de inóculo.....	108
3.13.	Cámara húmeda para la inoculación al tallo. a) Colocación del algodón rodeando el inóculo, b) humedecimiento con agua destilada estéril, c) colocación del plástico.....	108
3.14.	Volumen del cepellón al quitar la bolsa.....	113

3.15.	Lavado de la raíces en agua corriente.....	113
3.16.	a) Obtención del área de la raíz, b) Obtención de la altura.....	114
3.17.	Comparación del porcentaje de severidad aérea de los 13 aislamientos de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>G. roseum</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i> , y <i>Dematophora</i> sp. de marzo a diciembre de 2007 (de los diferentes aislamientos de <i>F. oxysporum</i> se tomó sólo el 15A en comparación de con las demás especies).....	122
3.18.	Esporulación de diferentes hongos en la inoculación por herida realizada al tallo. a) y b) <i>F. oxysporum</i> (aislamientos 6D y 15A), c) <i>Verticillium</i> sp., d) <i>F. solani</i> , e) <i>G. roseum</i> , f) Testigo, se observa el disco de medio de cultivo pero sin esporular. 5 días después de la inoculación.....	123
3.19.	Figura 3.19. Síntomas iniciales en tratamientos con aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . a) Testigo, b) Pérdida de color verde de pálido a amarillento, c) Clorosis con apariencia de deficiencia nutrimental y resaltando las nervaduras de la hoja, d) Verde pálido, e) Muerte apical de tallos de ramitas con caída de hojas, y f) amarillamiento. Todo en comparación al testigo (a). Síntomas observados el 21 de abril de 2007 (tres meses después de la inoculación).....	124
3.20.	Comparación de tratamiento testigo y síntomas iniciales a los tres meses después de la inoculación con <i>F. solani</i> . a) Testigo, b) Clorosis, c) Pérdida de coloración a verde pálido. Síntomas observados el 21 de abril de 2007 (tres meses después de la inoculación).....	124
3.21.	Testigo y síntomas iniciales a los tres meses después de la inoculación con <i>G. roseum</i> . a) Testigo, b) Clorosis con apariencia de deficiencia nutrimental, c) Muerte de ramitas. Síntomas observados el 21 de abril de 2007 (3 meses después de la inoculación).....	125
3.22.	Testigo y síntomas iniciales a los tres meses después de la inoculación con <i>Verticillium albo-atrum</i> . a) Testigo, b) Inicio de clorosis, c) Amarillamiento. Síntomas observados el 21 de abril de 2007 (3 meses después de la inoculación).....	125
3.23.	Comparación del testigo y <i>Dematophora</i> . a) Testigo, b) Ag. Follaje sin síntomas.....	125
3.24.	Síntomas intermedios, inducidos con aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . a) Testigo, b) amarillamiento y decaimiento generalizado, c) muerte regresiva de ramas. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).....	126
3.25.	Síntomas intermedios, inducidos con el aislamiento de <i>F. solani</i> . a) Testigo, b) amarillamiento del follaje generalizado, c) muerte regresiva de ramas. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).....	126
3.26.	Síntomas intermedios, inducidos con aislamientos de <i>G. roseum</i> . a) Testigo, b) amarillamiento del follaje generalizado,	

	c) muerte regresiva de la rama principal. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).....	127
3.27.	Síntomas intermedios, inducidos con aislamientos de <i>Verticillium albo-atrum</i> . a) Testigo, b) amarillamiento del follaje generalizado, y muerte regresiva de ramas. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).....	127
3.28.	Síntomas intermedios, inducidos con aislamientos de <i>Dematophora</i> sp. a) Testigo, b) y c) Pérdida de coloración de amarillo pálido a casi blanco, no hubo muerte de ramas. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).....	128
3.29.	Presencia de gomosis de color ámbar en el tallo. a) Testigo, se observa la herida de inoculación seca, pero sin gomosis, b), c) Aislamientos de <i>F. oxysporum</i> , d) Aislamiento de <i>G. roseum</i> . Inoculados el 28 de marzo, síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).....	128
3.30.	Síntomas avanzados. Ocasionados por el hongo <i>F. oxysporum</i> . a) Testigo sin inocular, b) amarillamiento generalizado, defoliación, c) pérdida de turgencia de las hojas, d) rama principal totalmente seca, e) panorámica de árboles con síntomas de amarillamiento, decaimiento y defoliación. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación)	130
3.31.	Síntomas avanzados. Ocasionados por el hongo <i>F. solani</i> . a) Testigo sin inocular, b) La rama principal completamente seca pero el follaje del portainjerto aún verdes, c) El follaje de las ramas del portainjerto sin turgencia, d) Panorámica de árboles con síntoma de amarillamiento, perdida de turgencia y defoliación, e) árbol muerto. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación).....	131
3.32.	Síntomas avanzados. Ocasionados por el hongo <i>G. roseum</i> . a) Testigo sin inocular, b) Amarillamiento generalizado, c) Rama principal completamente muerta, con follaje amarillento pero aún verdes las ramas del portainjerto, d) Panorámica del amarillamiento generalizado, e) Árbol completamente muerto. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación).....	132
3.33.	Comparación del tratamiento testigo con síntomas avanzados ocasionados por el hongo <i>Verticillium</i> . a) Testigo, b) árbol inoculado, con el follaje amarillo y adherido, c) la rama principal completamente muerta, las ramas del portainjerto aún verdes. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación).....	132
3.34.	Comparación del tratamiento testigo con los síntomas avanzados y ocasionados por <i>D. necatrix</i> . a) Testigo, b) árbol inoculado, con el follaje amarillo pálido y leve defoliación, c)	

	detalle de la coloración amarillo-pálido a casi blanco. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación).....	133
3.35.	Síntoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con diferentes aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento 5B, c) 6D, d) 7D, f) 10E, j) 15A, k) 16C, l) 18D, m) 21C, y n) 23D (cinco meses después de la inoculación).	136
3.36.	Síntoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con <i>F. solani</i> . Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento 8D (cinco meses después de la inoculación).....	137
3.37.	Síntoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con <i>G. roseum</i> . Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento 13D (cinco meses después de la inoculación).....	137
3.38.	Síntoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con <i>V. albo-atrum</i> . Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento 13' (cinco meses después de la inoculación).....	137
3.39.	Síntoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con <i>Dematophora</i> sp. Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento Ag (cinco meses después de la inoculación).....	138
3.40.	Necrosis café claro y oscuro en tallo, corona y raíz en árboles inoculados con cuatro aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. Aislamiento 5BR1: c) en tallo, d) en raíz principal. 6DR4: e) en tallo. 7DR1: f) en tallo, g) en raíz principal. 10ER2: h) en tallo, i) en raíz principal. 15AR2: j) en tallo (cinco meses después de la inoculación).....	141
3.41.	Necrosis en tallo, corona y raíz, y canchros en árboles inoculados con otros tres aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. 15AR2: c) en corona, d) en raíz principal. 16CR3: e) En tallo, f) formación de cancro en tallo, g) raíz principal sin necrosis. 18DR4: h) en tallo y corona, i) formación de cancro en tallo y necrosis interna, j) en raicillas (cinco meses después de la inoculación).....	142
3.42.	Necrosis en tallo, corona y raíz, y canchros en árboles inoculados con otros dos aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. Aislamiento 21CR1: c) formación de cancro en tallo, d) en tallo, e) en corona, f) en raíz principal y raicillas. 23DR: g) En tallo, h) en corona, i) en raíz principal, j) en raicillas (cinco meses después de la inoculación).....	143
3.43.	Necrosis en árboles inoculados con <i>F. solani</i> (aislamiento	

	8DR2). Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. c) En tallo, d) en corona, e) raíz principal (cinco meses después de la inoculación).....	144
3.44.	Necrosis en haces vasculares de árboles inoculados con <i>G. roseum</i> . Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. c) En tallo, d) en corona, e) en raíz principal, f) en raicillas (cinco meses después de la inoculación).....	145
3.45.	Necrosis de haces vasculares de árboles inoculados con <i>Verticillium albo-atrum</i> . Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. c) Coloración café rojiza en tallo, d) coloración café oscuro claro en corona, e) coloración café claro en raíz principal (cinco meses después de la inoculación)..	146
3.46.	Síntomas en árboles inoculados con <i>Dematophora</i> sp. Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. c) Tallo sin necrosis, d) raíz principal y corona, sin necrosis, e) necrosis de raicillas (cinco meses después de la inoculación)....	147
CAPITULO IV		
4.1.	Plantas de 5 meses de edad antes del proceso de desinfestación.....	156
4.2.	Sustrato comercial en las plantas de cinco meses de edad.....	156
4.3.	Desinfestación de raíces en hipoclorito de sodio. a) Sumergido en la solución desinfestante, b) lavado cinco veces con agua destilada esterilizada.....	157
4.4.	Inoculación de plantas de cinco meses, con heridas e inmersión a raíz desnuda. a) Desinfestación de raíces, b) sumergido en solución conidial.....	158
4.5.	Inoculación al tallo: a) herida con bisturí, b) inóculo en discos de medio, c) se cubrió con algodón el inóculo, d) cámara húmeda.....	159
4.6.	Esporulación en la herida de inoculación al tallo con aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . a). Testigo con el disco de inóculo en la herida pero sin esporulación fúngica, b) esporulación sobre el disco con inóculo y sobre el tallo, e incluso sobre el sustrato, c) esporulación abundante sobre el tallo (cuatro día después de la inoculación).....	162
4.7.	Esporulación en la herida de inoculación al tallo con <i>G. roseum</i> . a) el disco de medio no se observó pero sí la esporulación sobre el tallo, b) sobre el disco y el tallo (cuatro día después de la inoculación).....	162
4.8.	Síntomas observados en plántulas inoculadas con aislamientos de <i>F. oxysporum</i> . a) Testigo, b) pérdida de turgencia y defoliación, c) necrosis de la parte apical. Síntomas observados a los ocho días después de inoculadas.....	164
4.9.	Figura 4.9. Síntomas observados en plántulas inoculadas con aislamientos de: a) Testigo, b) <i>G. roseum</i> , c) <i>V. albo-atrum</i> , d) <i>Dematophora</i> sp. Síntomas observados a los ocho días	

	después de inoculadas.....	165
4.10.	Síntomas observados a los 15 días después de la inoculación en plántulas inoculadas con aislamientos de: a) Testigo, b) <i>F. oxysporum</i> (aislamiento 15A), c) <i>F. oxysporum</i> (aislamiento 6D), d) <i>G. roseum</i>	165
4.11.	Síntomas observados a los 15 días en plántulas inoculadas con aislamientos de: a) Testigo, b) <i>V. albo-atrum</i> , c) <i>Dematophora</i> sp.....	166
4.12.	Necrosis en plántulas inoculados con el aislamiento 15A y 6D de <i>F. oxysporum</i> . a) en tallo y raíz principal, b) en tallo, c) superficialmente en raicillas y la base del tallo) las raicillas, d) en raicillas, se observa unas mas oscuras que otras (15 días después de la inoculación).....	168
4.13.	Necrosis en tallo, raíz principal, y raicillas en plántulas inoculadas con diferentes aislamientos. <i>G. roseum</i> : a) en tallo, b) en raíz principal; <i>V. albo-atrum</i> : c) raíz principal, d) en raicillas; <i>Dematophora</i> sp.: e) raíz principal, f) tallo y raicillas (15 días después de la inoculación).	169
4.14.	Necrosis en tallo, raíz principal y raicillas en plantas sin inocular: a) Tratamiento testigo, b) sin tratamiento (plantas remanentes observadas).....	169

DETERMINACIÓN MORFOLOGICA, MOLECULAR Y PATOGENICA DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA MARCHITEZ Y MUERTE DEL DURAZNERO

MORPHOLOGIC, MOLECULAR AND PATHOGENIC DETERMINATION OF THE CAUSAL AGENTS OF PEACH TREE WILT AND DEATH

E. Sánchez-Trujillo¹; M. Acosta-Ramos²; M. J. Yáñez-Morales³; F. Ponce-González⁴; V. Manuel-Pinto⁵.

RESUMEN

Se abordó la problemática de la marchitez y muerte de árboles de durazno con los objetivos de: Determinar morfológica y molecularmente los agentes causales de la marchitez y muerte de árboles de durazno en Ocuituco y Tetela del Volcán, Morelos, así como demostrar la patogenicidad de los hongos aislados de plantas con síntomas de marchitez y muerte. De muestras de árboles con síntomas de clorosis, amarillamiento, muerte descendente de ramas, necrosis de haces vasculares en raíz, corona y tallo se aislaron e identificaron morfológica y molecularmente a los hongos: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Gliocladium roseum*, *Verticillium albo-atrum* y *Dematophora necatrix*. Los 13 aislamientos de los hongos antes señalados fueron los agentes causales de los síntomas mencionados en campo e inducidos en árboles de durazno de 1.5 años y plántulas de 5 meses de edad, identificándose los reaislamientos como las especies inoculadas y cumpliéndose con los postulados de Koch. El aislamiento 6D de *F. oxysporum* fue el que indujo el porcentaje de incidencia mayor y el aislamiento 15A de *F. oxysporum* fue el que presentó el porcentaje de severidad mayor (porcentaje de infección). El aislamiento 18D de *F. oxysporum* fue el que más afectó el ancho de copa de los árboles de durazno; *D. necatrix* fue el que más afectó el número ramas totales, mientras que *G. roseum* fue el que indujo el mayor número de ramas muertas, 270 días después de la inoculación. En plántulas de cinco meses de edad se indujeron los síntomas y reaislaron los mismos hongos inoculados. Además, se aisló a *F. oxysporum* y *F. solani* de plántulas testigo y otras no inoculadas. Por lo que se infirió que la infección se dio desde que se produjeron los portainjertos en el vivero, posiblemente por utilizar sustrato sin esterilizar.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Gliocladium roseum*, *Verticillium albo-atrum*, *Dematophora necatrix*, diagnóstico, patogenicidad, incidencia y severidad.

ABSTRACT

The problem of peach tree wilt and death was broached with the following objectives: to determine the causal agents of peach tree wilt and death both morphologically and molecularly at Ocuituco and Tetela del Volcán, Morelos, to also demonstrate the pathogenicity of isolated fungi in plants showing symptoms of wilt and death. The fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Gliocladium roseum*, *Verticillium albo-atrum* and *Dematophora necatrix* were morphologically and molecularly isolated and identified in tree samples showing symptoms of chlorosis, yellowing, descendant death in branches, and necrosis of vascular bundles root, stem and crown. The thirteen isolations of the aforementioned fungi were the causal agents in the field of symptoms previously described which were induced in 1.5 year old peach trees and 5 month old seedlings. The re-isolations were identified as the inoculated species and behaved in accordance to Koch's postulates. The isolation of 6D of *F. oxysporum* induced the highest percentage of incidence. The 15A isolation of *F. oxysporum* presented the highest percentage of severity (infection percentage). The 18D isolation of *F. oxysporum* had the greatest effect on the width of the crown of the peach trees. *D. necatrix* affected the highest total number of branches, while *G. roseum* induced the highest number of dead branches 270 days after inoculation. In five month old seedlings the symptoms were induced and the same inoculated fungi were re-isolated., *F. oxysporum* and *F. solani* were also isolated in control plantlets and other seedlings not inoculated. It was therefore inferred that infection originated in the graft holders and were produced in the nursery, possibly because unsterilized substrate was used.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Gliocladium roseum*, *Verticillium albo-atrum*, *Dematophora necatrix*, diagnosis, pathogenicity, incidence and severity.

¹ Tesista de la maestría de Protección Vegetal. Parasitología Agrícola. UACH.

² Profesor-Investigador del Departamento de Parasitología Agrícola. UACH.

³ Profesor- Investigador del Instituto de Fitosanidad. Colegio de Posgraduados

⁴ Profesor-Investigador del Departamento de Parasitología Agrícola. UACH.

⁵ Profesor-Investigador del Departamento de Parasitología Agrícola. UACH.

DETERMINACIÓN MORFOLOGICA, MOLECULAR Y PATOGENICA DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA MARCHITEZ Y MUERTE DEL DURAZNERO

INTRODUCCION

El durazno es uno de los frutos más importantes del mundo. En México después de 400 años de su introducción por los españoles, todavía es considerado de explotación reciente. Es la especie frutícola de regiones templadas más ampliamente distribuida en México, desde las zonas secas y frías en el norte del país, hasta ambientes subtropicales con una mínima acumulación de frío y prácticamente nulo riesgo de heladas. Si bien el cultivo se ha incrementado en extensión, el rendimiento ha decrecido. También la demanda por el durazno se ha incrementado, pero dada la reducida producción, se ha tenido que recurrir a las importaciones (INFOASERCA, 2002).

El futuro del cultivo del durazno se puede resumir en el desarrollo de un programa de investigación agresivo, que permita conjuntar las mejores características de los duraznos criollos y las selecciones que se han logrado, o de material importado, y el manejo fitosanitario.

En este aspecto será de gran importancia la participación de las instituciones de investigación en conjunto con las de gobierno y los productores, a fin de mejorar la calidad y los rendimientos, de tal forma que se beneficie a las personas involucradas en la cadena productiva.

Con respecto a la región de estudio, el estado de Morelos, éste se distingue por tener regiones productoras de frutas tropicales, más de clima frío como es la región norte, donde destaca la producción de durazno en los municipios de Yecapixtla, Ocuituco, Tétela del Volcán, y Zacualpan de Amilpas (Simental, 2004)

JUSTIFICACIÓN

Un factor importante en la economía de los productores es el manejo de plagas y enfermedades que merman la producción. Además de las enfermedades ya conocidas del duraznero, en regiones de los municipios mencionados anteriormente se presenta otra enfermedad. Esta es la muerte de árboles y la sintomatología observada no corresponde a lo reportado para este cultivo, por lo que se especula que es una nueva enfermedad.

Aún cuando el desarrollo de la enfermedad no ha sido catastrófico, sino más bien paulatino, los productores argumentan que cada año se reduce un 10% aproximadamente su área productiva y ya no la recuperan debido a que no se elimina el problema, es decir, replantan árboles jóvenes y se mueren en un lapso de cuatro años, por lo que optan por abandonar la actividad. Si en todo el estado se deja de producir durazno se estaría perdiendo aproximadamente seis mil toneladas, lo que equivale a casi 37 millones de pesos de ingreso a la economía de los agricultores.

Por lo anterior es de suma importancia iniciar estudios que permitan esclarecer la etiología del problema, con el fin de determinar las medidas de control requeridas.

OBJETIVOS

Objetivo general

1. Identificar y caracterizar molecularmente los agentes causales de la marchitez y muerte del duraznero en el estado de Morelos

Objetivos específicos

1. Identificar el o los agentes responsables de la marchitez y muerte de árboles de durazno.
2. Demostrar la patogenicidad del o los hongos aislados de plantas marchitas y muertas.
3. Caracterizar molecularmente el o los patógenos identificados.

HIPÓTESIS

1. La muerte del duraznero en el estado de Morelos es causada por hongos en raíz.
2. Los hongos aislados de muestras plantas marchitas y muertas son patogénicos.
3. La caracterización molecular comprobará la identificación morfológica.

CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. EL CULTIVO DEL DURAZNERO

1.1.1. Origen

El durazno [*Prunus persica* (L.) Batsch] es un frutal originario de china, de donde se difundió su cultivo a Persia, de ahí que se le denominó a la especie *persica*. Durante mucho tiempo se pensó que el durazno era originario de Persia, pero según traducciones recientes de literatura china que datan de 2,000 años antes de la era cristiana ya lo mencionaban, por lo que es probable que de esa región de Asia pasara a Persia. Posteriormente fue introducido a Europa, de donde Colón en uno de sus viajes trajo semillas a América, adaptándose y multiplicándose, lo que dio origen a un gran número de variedades criollas adaptadas al clima y suelo de las diferentes regiones donde se plantaron (Rom, 1988b).

Los exploradores españoles fueron los que trajeron el durazno al Nuevo Mundo, y fue introducido al continente Americano y particularmente a México durante el año 1600, sin embargo, por cerca de tres siglos el cultivo y selección de nuevas variedades de durazno estuvo largamente confinado a los jardines de la nobleza, mientras que el cultivo a gran escala con objetivo comercial inició en los Estados Unidos hasta el siglo XIX. Para el caso concreto de México, según algunas evidencias, huesos de esta fruta fueron traídos por los españoles en el siglo XVI. Gonzalo Fernández de Oviedo, en su Historia General y Natural de las Indias, indicó que trajo de Toledo, España, huesos de durazno y de melocotón, los cuales se sembraron en diversos lugares de la Isla Española, hoy conocida como República Dominicana, sin que hubieran nacido las plantas, sin embargo, huesos de esta fruta germinaron en tierra firme de México, así como en otros países templados y cálidos de América. Hoy en día el cultivo en

México se extiende a casi todo el territorio, bajo condiciones climáticas muy variadas (INFOASERCA, 2002).

1.1.2. Clasificación taxonómica

El durazno, según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica para las Plantas Cultivadas, tiene la siguiente clasificación taxonómica (Rom, 1988a):

Reino: Vegetal

División: Espermatofita

Subdivisión: Angiosperma

Clase: Dicotiledoneae

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Tribu: Pruneae

Género: *Prunus*

Subgénero: *Amygdalus*

Especie: *persica*

1.1.3. Características botánicas (Figura 1.1)

Raíz. Es pivotante con raíces secundarias algunas veces más gruesas que la principal, ramificadas, extendidas, poco profundas (Figura 1.1); y tienen un color anaranjado con lenticelas muy evidentes. En sentido vertical las raíces ocupan una capa comprendida entre los 0-20 y los 80-100 cm. En árboles adultos de durazno “Nemeguard” con riego por gravedad, se reporta que entre los 20 y 80 cm de profundidad se encuentra el 65% de las raíces; y abarcan una distancia horizontal de 0 a 160 cm del tronco. Con el paso de los años el efecto positivo del laboreo inicial se atenúa y empeoran las condiciones físicas del suelo, lo que provoca que las raíces suban hacia las capas más superficiales (Fideghelli, 1987; Díaz, 2002).

El tallo, hojas, flores y frutos tienen las siguientes características (Fideghelli, 1987; Coletto, 1995; Agustí, 2004):

Tallo. El tronco es cilíndrico, robusto, madera fuerte, de color cenizo. La del tronco y las ramas es de color gris más o menos oscuro con tonalidad rojiza. Las ramas, según las dimensiones y la distribución de las yemas de flor se clasifican en: ramas mixtas, chifonas, ramas de mayo y chupones. La rama mixta tiene una longitud variable de 20-30 hasta 80-100 cm. La chifona es más débil que la mixta, con una longitud de 15 a 30 cm. La de mayo es una rama de pocos centímetros de longitud; y el chupón es una rama de vigoroso desarrollo, crece en posición vertical, y emite numerosas ramas.

Hojas. Las hojas son oblongas, lanceoladas, de color verde, con una longitud generalmente de 140-180 mm y una anchura de 40-50 mm; el limbo es liso, a veces ondulado a lo largo del nervio central, los bordes son serrados o doblemente dentados. Generalmente sólo hay una hoja por nudo, muy pocas veces aparecen dos o tres pero sólo en las ramas vigorosas. La foliación es posterior a la floración.

Flor. Las flores pueden ser solitarias o en grupos de tres a cuatro, son de dos tipos: rosáceas y campanuláceas. Las primeras tienen los pétalos grandes, de color rosa claro, abiertos; las segundas tienen los pétalos más pequeños, de color rosa intenso y no se abren completamente. El cáliz es gamosépalo, corola color rosa pálido pero puede variar desde rojo hasta blanco. Ovario supero, monocarpelar, uniovulado, estambres libres, indefinidos (de 20 a 25). La floración tiene lugar desde fines de febrero a abril, según la latitud, altitud, la exposición, y la variedad. Casi todas las variedades son autofértiles y por tanto no necesitan de otro polen. La polinización es casi exclusivamente entomófila. El insecto más importante para el transporte del polen es la abeja doméstica, seguida por otros himenópteros.

Fruto. Es una drupa (pericarpio membranoso, mesocarpio pulposo, endocarpio leñoso), de forma más o menos globosa con una línea de sutura y una cavidad alrededor del pedúnculo. Las formas que se presentan con más frecuencia son: redonda, oblata, elíptica, ovalada. El pericarpio puede ser adherente a la pulpa o fácilmente separable. La pulpa puede ser de color amarillo (del amarillo claro al anaranjado) o blanco. Es frecuente el caso de pigmentación roja en la pulpa, en algunos casos puede cubrir casi completamente el color del fondo. El hueso puede ser adherente a la pulpa o libre. La almendra que encierra el hueso, es la semilla dicotiledónea y carece de endospermo.

El tamaño del fruto depende de la variedad utilizada y puede variar de 5 a 10 cm de diámetro, para la variedad Diamante se reportan pesos promedios de 110 -120 g (Rodríguez y Sherman, 1995).

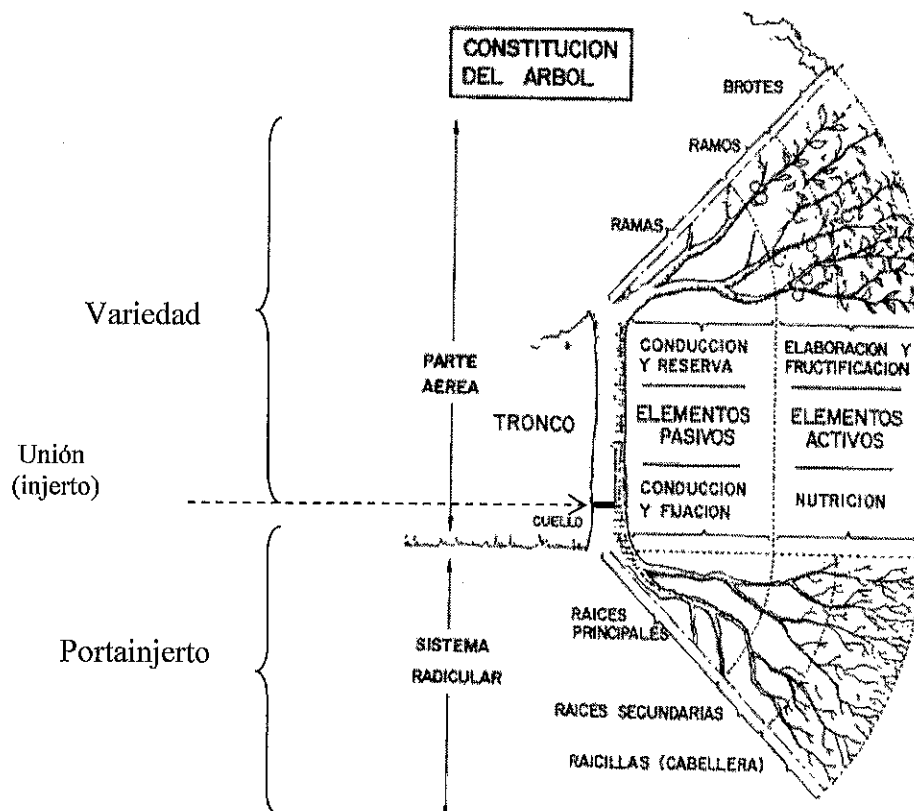


Figura 1.1. Representación de la estructura de un árbol según Gil-Albert (1989).

1.1.4. Requerimientos edáficos y climáticos

Estos son (Norman y Wayne, 1988; Pérez, 1990 y 1995):

Edáficos. Un buen suelo para cultivar duraznero deberá tener una profundidad mínima de 1.5 m, una pendiente entre el 1 al 5%, buen drenaje y evitar encharcamientos. El pH debe ser lo más cercano a 7.

Climáticos. El durazno se desarrolla en climas templados y fríos. Es importante la temperatura, precipitación y cantidad de luz.

- a) Temperatura. La temperatura ideal para su crecimiento varía de 18 a 30 °C de abril a octubre y entre 2 y 12° C el resto del año. Soporta temperaturas inferiores a los 15° C; los brotes florales pueden soportar -3° C, las flores abiertas -2.5° C, y los frutos recién formados -1.6 ° C.
- b) Precipitación. La cantidad de agua dependerá del volumen de total de suelo explorado por las raíces, pero los durazneros prosperan en regiones con precipitación de 650 a 700 mm, llegando a requerir desde 1500 a 2000 m³ ha¹.
- c) Luz. En general, los árboles requieren de un mínimo de 30% de luz directa y un máximo de 70%.

1.1.5. Periodos anuales de vegetación

Se presentan dos periodos claramente definidos: el reposo invernal y el periodo de actividad vegetativa (Gil-Albert, 1989).

- a) Periodo de reposo invernal. Este periodo coincide normalmente con el final del otoño y con la época invernal. En este periodo el árbol no

muestra actividad vegetativa aparente y no hay crecimiento ni floración, y las hojas se caen. Algunos procesos fisiológicos, tales como la absorción radical, la translocación vascular, la respiración, la fotosíntesis y la transpiración pueden tener lugar en forma lenta y poco intensa.

- b) Periodo de actividad vegetativa. A fines de invierno o principios de primavera. Durante este periodo el árbol realiza intensamente todos sus procesos fisiológicos, y ello se traduce exteriormente en el desarrollo vegetativo de brotes y ramas, en la aparición de flores y frutos, así como el engrosamiento de ramas y el tronco.

1.1.6. Importancia mundial del durazno (Cuadro 1.1)

Respecto a datos estadísticos de producción y comercialización del durazno a nivel mundial, la FAO registra los siguientes datos (FAOSTAT, 2004):

Superficie plantada. En el año 2003 alcanzó casi 3 millones de ha. China está en primer lugar con el 28.11%, Italia con el 2.29%, y EUA con 1.86%.

Superficie cosechada. A nivel mundial cinco países aportan el 65.85% de la producción total. En primer lugar se encuentra China con el 26.15%, desde 1993 Italia 13.21 (antes ocupaba el primer lugar), Estados Unidos 11.23, España 7.86, y Grecia 7.39%. En 34.15% se encuentran el resto de los países a nivel mundial, incluyendo a México.

Exportaciones. Los principales países exportadores de durazno en fresco en orden de importancia son: Italia, España, Estados Unidos de América, Chile, Grecia y Francia.

Importaciones. Los principales importadores de durazno en orden de importancia son: Alemania, Canadá, Estados Unidos, y Bélgica.

Cuadro 1. 1. Importancia mundial del durazno*.

País	Superficie plantada (ha)	Producción (ton)	Exportaciones (miles ton)	Importaciones
China	602,700	5,529,366	-	-
Italia	97,497	1,357,352	394,409	-
EU.	75,543	1,396,690	131,030	57,544
España	70,623	1,284,800	342,909	-
Grecia	52,500	800,000	99,997	-
Francia	19,100	-	91,977	-
Alemania	-	-	-	285,284
Canadá	-	-	-	67,070

*FAOSTAT, 2005.

1.1.7. Importancia en México (Cuadro 1.2)

Superficie plantada. Estas son 610 mil ha, de las cuales el 22.39% se cultiva bajo sistema de riego y 77.60% en condiciones de temporal. Zacatecas ocupa el primer lugar con el 88% de plantaciones temporal y el 12% bajo condiciones de riego (INEGI, 1999; SIACON, 2004).

Producción. En México se realiza en la actualidad en un poco más de dos decenas de estados. Según el Anuario Agrícola (INEGI, 1999), se considera que se produce en 24 estados. Destacan de manera importante: Zacatecas (21.94%), Michoacán (17.38%), Chihuahua (13.44%), Estado de México (12.85%), Puebla (5.71%), Morelos (4.01%), y Chiapas (2.64%) (SIACON, 2004).

En 2002, se produjeron alrededor de 147,211 ton de durazno, de las cuales 348 se exportaron y se importaron 30,068 ton, principalmente de Chile (49.86%), Estados Unidos (49.88), y otros países (Corea del Sur, Panamá y Taiwán); por lo que el consumo del durazno fue de 156,875 ton, lo que corresponde a 1.73 kg de consumo *per capita* (INFOASERCA, 2002).

El rendimiento promedio fue fluctuante a través de los años, pero de 1999-2003 es de 8.1 ton ha⁻¹. Chihuahua destaca por su sistema de producción con tecnología media a avanzada, principalmente en condiciones de riego y con variedades mejoradas, teniendo como consecuencia el rendimiento más alto de 19 ton ha⁻¹ (SIACON, 2004).

Exportaciones (INFOASERCA, 2002). México no tiene presencia en el mercado internacional, por sus superficies, producción y rendimientos reducidos no puede competir con regiones como la europea (a la que se considera líder en esta fruta) y que aporta el 35.76% de la producción mundial. Las exportaciones mexicanas en 1990-2002 apenas alcanzaron 2,467 t (alrededor de 400 t por año) con un ingreso de 2.6 millones de pesos. Los principales países a donde se exportó fueron Estados Unidos (89.03%), Centro y Sudamérica.

Importaciones. Durante 1990-2002 han sido arriba de 19 mil ton, y en el 2002 por encima de las 30 mil t. Chile y EUA fueron los que más exportaron a México (49.8%) (INFOASERCA, 2002).

Cuadro 1.2. Importancia nacional del durazno*

Estado	Superficie plantada (ha)	Producción (t)	Exportaciones (t)	Importaciones (t)
Zacatecas	26,402	13,114	-	-
Michoacán	4,290	30,535	-	-
Chihuahua	1,142	21,460	-	-
México	2,550	16,353	-	-
Puebla	2,240	14,019	-	-
Morelos	1,600	9,666	-	-
Nacional	610,000	147,211	348	30,068

*SIACON, 2004; FAOSTAT, 2004

1.1.8. Importancia en el estado de Morelos

Según fuentes de información oficiales (SEDEAGRO, 2002; SIACON, 2004) en el 2003, el estado produjo 9,666 t con un valor de 44.5 millones de pesos:

En la región oriente-norte de este estado, existen aproximadamente 1,600 ha⁻¹ de plantaciones de durazno con variedades como Diamante, Amapre, Oro Azteca, y Oro Mex (en orden de importancia), en los municipios de Ocuilco, Tétela del Volcán, Yecapixtla y Zacualpan de Amilpas. En 2003 se obtuvieron 3,959 t, lo que representó el 2.65% de la producción nacional y el 40.95% a nivel estatal. Con una participación en el valor de la producción de 23.7 millones de pesos.

1.1.9. Forma de cultivo en México

La técnica empleada en México para el cultivo es la siguiente (Díaz y Martínez, 1988; Rodríguez, 1988; Pérez, 1990 y 1995; Zegbe *et al.*, 2005):

Portainjertos utilizados. En México se han originado portainjertos de semilla y por estaca. De semilla se reportan: Coacalco, S100, Tetela 01-8, Tetela 01-9, y Criollo; y de estaca a Colín.

Variedades cultivadas. En México se distinguen dos tipos de durazno: amarillo y blanco. Las principales variedades cultivadas son: Diamante, Desert Gold, Early Read Heaven, Florida Gold, Florida Prince, Florida King, Loring y Red Heaven.

En Sonora se cultivan las diferentes variedades Florida (Gold, King y Prince), en Chihuahua se producen las Loring Red Heaven; y en los estados de México, Michoacán y Morelos las Desert Gold y Diamante.

También se utilizan materiales criollos (sin injertar) tanto para el consumo en fresco como para el consumo industrial en los estados de Aguascalientes, Zacatecas, Michoacán, México y Puebla.

Propagación de plantas. Puede ser asexual o sexual. La primera es la multiplicación masiva de plantas a partir de porciones vegetativas (raíces, tallos, hojas, yemas y/o embriones) y/o células individuales o grupo de células que provienen de una sola planta. La segunda es por el uso de semilla.

Vivero. La semilla se obtiene a partir de árboles seleccionados previamente por su productividad y adaptación a las condiciones locales de suelo. La fruta se despulpa, lava y seca a media sombra, sin amontonar, y se guarda en lugares secos y frescos hasta su utilización. Durante el invierno las semillas se estratifican en un ambiente frío (5° C) y húmedo (sin encharcamientos). Para tal fin se usan cajas de plástico con hoyos en la base para facilitar el drenaje. Ahí se ponen capas de arena intercaladas con hueso de durazno y se colocan en un cuarto frío durante seis a ocho semanas. Posteriormente dichas cajas se extraen del ambiente frío y se colocan en una temperatura entre 20 y 25° C. Después de una semana las semillas empiezan a germinar y se transplantan a bolsas de polietileno perforadas en la base. Las bolsas se llenan con una mezcla de suelo (2 partes), arena (1 parte) y materia orgánica (1 parte) esterilizada con vapor o algún biocida de amplio espectro.

Después de 90 a 120 días las plántulas están listas para injertarse (cuando el tronco rebase los 4.5 mm de diámetro). El injerto más comúnmente utilizado es el tipo T, nombre que se deriva de la forma que toman los cortes que se hacen en el portainjerto para poder insertar la yema.

Establecimiento del huerto. La mejor época de plantación es en junio, una vez que las lluvias estén bien establecidas. Si se cuenta con riego y no se tiene

problemas de heladas, es en diciembre y enero con árboles desarrollados en bolsa o a raíz desnuda.

Las cepas se hacen de 40x40x40 cm para acomodar fácilmente el cepellón (raíz) de la planta. Al excavar la cepa, se separa la tierra extraída de los primeros 20 cm de arriba, que es más fértil y al momento de la plantación se coloca en la mitad inferior de la cepa y después de colocada la planta, y se termina de llenar la cepa con la tierra restante.

Plantación. Se puede efectuar en “marco real” y “tresbolillo”, siendo el método de marco real el más común, a distancias de: 5 x 5 o 4 x 3 m, con lo que se obtienen densidades de plantación de 400 y 833 árboles por ha⁻¹, respectivamente.

Fertilización.

Durante los primeros cuatro años del cultivo (cada año) se sugiere fertilizar el terreno con 25 kg de nitrógeno, 25 de fósforo y 25 de potasio por hectárea en la época de lluvias, o bien con el primer riego del año.

En los huertos en producción se recomienda aplicar 65 kg de nitrógeno, 65 de fósforo, y 65 de potasio (cada año).

Riegos. Los riegos deben ser ligeros y frecuentes durante los meses más cálidos, el primer riego se debe realizar cuando el árbol empieza a salir de su letargo invernal. En los meses de poco calor se deberá dar un riego de 20 a 25 días de acuerdo a la textura del suelo, con volúmenes de agua de 1000 a 1200 m³/ha y en meses mas calurosos se espaciaron de 12 a 20 días, es decir anualmente se darán de 11 a 14 riegos según la temperatura.

Poda. La primera poda se hace después de plantar, se despuntan los arbolitos a una altura de 70 a 90 cm. y durante su primer año de vida se promoverá el crecimiento de dos a cuatro ramas principales que crezcan en direcciones opuestas y que constituirán la estructura básica. Se eliminan todos los brotes en los primeros 20-30 cm del tronco tan pronto como aparezcan estando aún tiernas. Después de dos ciclos de crecimiento se inicia la poda de fructificación que consiste en dejar sólo un cierto número de ramas mixtas, y el criterio para realizarla deberá basarse en experiencias obtenidas en cada región, pero en todos los casos se debe considerar: eliminar siempre los chupones y las ramas mal ubicadas, enfermas o secas, evitar que el árbol sobrepase de los 3 a 3.5 m de altura, evitar un número excesivo de ramas mixtas que conduzcan a una sobreproducción. El aclareo y podas sanitarias deben hacerse para dar una vida larga a los árboles.

Aclareos de frutos. Con el aclareo se pretende eliminar frutos atacados por insectos o enfermedades, disminuir el riesgo de que se desgarran las ramas demasiado cargadas de frutos y eliminar un mayor porcentaje de frutos en posiciones menos soleadas.

Cosecha. Se cortan los frutos uno o varios días antes de su madurez, considerando el tipo de variedad de que se trate (algunas maduran muy rápido). Los meses que generalmente se presenta las cosechas son: máximas en septiembre, medias en julio y agosto; y mínimas en julio y octubre.

1.2. ENFERMEDADES FUNGOSAS DEL DURAZNERO

Dentro de la problemática del duraznero detectada a nivel nacional la presencia de heladas tardías y los problemas fitosanitarios tales como enfermedades y plagas. En México las enfermedades fungosas que atacan al durazno son varias. En follaje y tallo: cenicilla polvorienta (*Podosphaera oxiacanthae*, y *Sphaerotheca pannosa*), mancha foliar (*Stereum purpureum*), verrucosis

(*Taphrina deformans*), roya (*Tranzschelia discolor*), canchros de las ramas (*Valsa leucostoma*), y tiro de munición (*Coryneum beijerinckii*). En fruto: pudrición morena o café del fruto (*Monilinia fructicola*). Más: pudrición de la raíz y base del tallo (*Phytophthora* spp.), y pudrición de la raíz (*Phymatotrichopsis omnivora*) (Orozco, 1991).

En el cuadro 1.3 se resumen las enfermedades anteriores y otras más que se describen a continuación y así como síntomas relacionados a la enfermedad de estudio.

Cuadro 1.3. Enfermedades fungosas en duraznero.

Enfermedad	Agente causal	Síntomas	Referencia
<u>Hoja</u>			
Cenicilla	<i>Sphaerotheca pannosa</i> y <i>Podosphaera oxianthae</i>	Polvoriento de color blanco grisáceo.	Pérez, 1990; Orozco, 1991.
Roya	<i>Tranzschelia discolor</i>	Manchas amarillentas en el haz y en el envés, y pústulas café canela, y polvosas.	Agrios 2005; Romero, 1993.
Tiro de munición	<i>Coryneum beijerinckii</i>	Lesiones pardo rojizo de 1-3 mm de diámetro que se desprenden.	Orozco, 1991; Romero, 1993.
Verrucosis del duraznero	<i>Taphrina deformans</i>	Deformación de hojas, coloración amarillo-rojiza.	Agrios, 2005.
<u>Fruto</u>			
Pudrición café	<i>Monilia fructicola</i>	Podredumbre de frutos.	Agrios, 2005; Romero, 1993.
<u>Ramas y troncos</u>			
Muerte regresiva	<i>Cytospora persicae</i>	Muerte de ramas y tronco en árboles jóvenes y viejos.	Amal <i>et al.</i> , 1982.
Fusicocum	<i>Fusicoccum amygdali</i>	Secado y canchros de las ramas, y puede ocasionar la muerte del árbol.	Serizawa, 1984; Jailloux, 1985; Abbruzzetti, 1997.
<u>Cuello y raíz</u>			
Pudrición texana	<i>Phymatotrichopsis omnivora</i>	Follaje amarillamiento y bronceamiento. En raíz lesiones café y se desprende fácilmente la corteza.	Aceves y Téliz, 1984; De la Torre, 1985; Lyda, 2000.
Podredumbres de raíz y corona	<i>Armillaria mellea</i>	Crecimiento apical pobre y hojas de poco tamaño, el árbol se colapsa con las hojas adheridas. Presencia de rizomorfos.	Anderson, 1986; Proffer <i>et al.</i> , 1987; Smith, 1992.
Podredumbres de raíz y corona	<i>Phytophthora</i> spp.	Hojas escasas, pequeñas y cloróticas, amarillamiento y marchites. Pudrición de corona, canchros, estrangulamiento y	Mircetich, 1982; Wilcox y Mircetich, 1985; Haygood <i>et</i>

		muerte.	<i>al.</i> , 1986.
Raíz			
Marchitamiento	<i>Verticillium</i> spp.	Marchitamiento, amarillamiento y secamiento de hojas.	Pérez, 1990; Gubler, 2000.
Podredumbre de raíz	<i>Rosellinia necatrix</i>	Amarillamiento prematuro del follaje y pobre crecimiento de ramas. Caída de frutos. Pudrición de raíces.	Sivanesan y Holliday, 1972; Szejnberg y Madar, 1980; Szejnberg, 1990.
Podredumbre violeta de la raíz	<i>Helicobasidium mompa</i>	Crecimiento reducido del brote; hojas pequeñas de color verde claro; muerte súbita de ramitas y brotes	Araki, 1967; Harada y Segawa, 1990.
Secazón o muerte repentina	<i>Fusarium</i> spp. , <i>Phytophthora cinnamomi</i> y <i>Pythium</i> sp.	Pudrición seca y muerte de las raíces, amarillamiento del follaje, pérdida de turgencia (flacidez) de hojas y secamiento de las ramitas, muerte súbita de la planta.	Rondón, 1990; González, 1993; Suárez <i>et al.</i> , 1999; Aponte <i>et al.</i> , 2001.

1.2.1. Enfermedades del cuello y raíz

1.2.1.1. Podrición texana por *Phymatotrichopsis omnivora* (Duggar) Hennebert

Es una enfermedad con origen en el suelo y se encuentra ampliamente distribuida en el noreste de México y Sureste de los Estados Unidos de América. Ataca al "durazno" en suelos con pH neutro o alcalino (De la Torre, 1985).

Síntomas

Generalmente los árboles infectados se encuentran aislados en el campo. Al principio las hojas muestran amarillamiento y bronceamiento, posteriormente se marchitan, empardecen y se secan pero se mantienen unidas al árbol. La corteza y cambium de las raíces y parte baja del tallo sufren una pudrición firme y de color café. Es una enfermedad fulminante ya que en ocasiones en una

misma temporada, los árboles afectados se marchitan y mueren (Flores y Pinto, 1984; Lyda, 2000).

Características morfológicas

Forma cordones miceliales de color café, compuestos por hifas fuertemente entretejidas y cubiertos por ramas cruciformes con terminales aciculares; esclerocios de color café oscuro y de forma irregular (individuales o en grupo), conidioforos provistos de ramas cortas, hinchadas, de las cuales nacen numerosos conidios globosos a ovals, unicelulares, hialinos, de 4.8 a 5.5 μm de diámetro. Los esclerocios sobreviven hasta por 12 años en suelos no cultivados y sin maleza. El hongo entra en plena actividad en el verano con temperaturas óptimas de 25 a 30° C y es particularmente frecuente en suelos de origen calcáreo con pH de 7.8 (Romero, 1993; Lyda, 2000).

1.2.1.2. Podrición de la raíz y de la corona por *Armillaria mellea* (Vahl. Fr.) P. Kumm

Síntomas

Los árboles infectados cuando tienen más de cinco años muestran frecuentemente un crecimiento de la parte apical pobre y hojas de poco tamaño. El follaje permanece muchas veces verde hasta mediados de verano, cuando todo el árbol se colapsa con las hojas adheridas. Esto en vez de un gradual amarillamiento de las hojas seguido de defoliación, es indicativo de la podredumbre de la raíz por *Armillaria*. Una alfombrilla fúngica blanca y en forma de abanico se forma entre la corteza y la madera en la corona radicular de los árboles afectados. En la superficie de la corteza, se pueden observar rizomorfos filiformes, de color pardo oscuro a negro, del tamaño de un cordón de zapato. Estos se encuentran también en las raíces muertas, en la superficie de las raíces vivas delante del tejido necrótico, y en la tierra alrededor de las raíces de

los árboles infectados. En otoño pueden surgir racimos de basidiocarpos en la base de los árboles muertos (Smith *et al.*, 1992).

Características morfológicas

Basidiocarpos (fase sexual). El píleo al principio tiene forma de cúpula pero después se comprime por el centro y el margen se vuelve hacia arriba, dejando las laminillas completamente expuestas. En los estípites jóvenes es muy notoria la presencia de un anillo membranoso blanco (Romero, 1993).

Las colonias producidas en cultivo por basidiosporas haploides simples producen un crecimiento micelial esponjoso, mientras que las colonias producidas por micelio diploide producen un crecimiento micelial plano, costroso y con frecuencia oscuro (Smith *et al.*, 1992).

Infecta a durazno, más chabacano, forestales, manzana, ornamentales, y plantas leñosas autóctonas. Puede existir en un huerto antes de la plantación porque los rizomorfos pueden sobrevivir en el suelo o en las raíces muertas infestadas. Se extiende dentro de las plantaciones por los rizomorfos (Profter *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1992)

1.2.1.3. Podrición de la raíz y corona por *Phytophthora* spp.

Estas se encuentran entre las enfermedades más importantes transmitidas por el suelo y afectan a los frutales de hueso. La enfermedad se presenta en todo el mundo, con importantes pérdidas en todos los principales frutales, y a todas las edades de los árboles pueden ser afectados como resultado ocurre la muerte de éstos (Browne y Mircetich, 2000).

Síntomas

Los síntomas de esta enfermedad son visibles en la parte aérea, corona y raíces. Las hojas de los árboles afectados son normalmente escasas, pequeñas y cloróticas, pueden presentar amarillamiento y marchites. Los brotes muestran crecimiento insuficiente del brote, muerte súbita de estos y de las ramas. Los frutos pueden ser pequeños, fuertemente coloreados y quemados por el sol. El síntoma podredumbre de la corona (base del tronco) tiene varios tonos de color pardo que se pueden extender a las capas exteriores del tejido del xilema. Cuando el síntoma se extiende se desarrolla un cancro, a menudo acompañado de goma que exudan de la corteza afectada. Los cancos están limitados muchas veces al tejido subterráneo de la corona, pero a veces se extienden verticalmente hasta el tronco y ocasionalmente a las ramas principales; los árboles circundados tienen una muerte eventual (Wilcox y Ellis, 1989; Haygood *et al.*, 1986).

Los árboles afectados tienen con frecuencia pocas raíces absorbentes, y las que quedan están muchas veces podridas, con colores pardo oscuro a negro y el árbol muere en varias semanas o meses desde que aparecieron los primeros síntomas, y en otros casos el deterioro del árbol es gradual prolongándose durante varias estaciones. El síntoma tiende a ser más rápido en viveros y plantaciones jóvenes que en árboles grandes y bien establecidos (Wilcox y Mircetich, 1985).

Especies reportadas en durazno

Las pudriciones del cuello por *Phytophthora* son causadas por un conjunto de especies (*P. cactorum*, *P. megasperma*, *P. cambivora*, *P. drechsleri*, y *P. cryptogea*) que son capaces de producir daños significativos, cuando los suelos están extremadamente húmedos o encharcados. Todas las especies poseen

hifas cenocíticas hialinas, esporangios que liberan zoosporas; anteridios, oogonios y oosporas (Brown y Mircetich, 2000; Zebge *et al.*, 2005).

1.2.1.4. Marchitez por *Verticillium* spp.

El marchitamiento por *Verticillium* de los frutales de hueso, también llamado corazón negro, verticilosis por *Verticillium*, marchitamiento de las ramas y marchitamiento vascular, está presente en muchas partes del mundo y causa graves pérdidas económicas (Gubler, 2000).

En México, aunque asociados a otros patógenos del suelo como *Armillaria mellea* y *Rosellinia necatrix*, se reporta a *Verticillium* sp. atacando durazno en la región sur del Estado de México, en los municipios de Almoloya de Alquisiras, Coatepec Harinas, y Temascaltepec (Elías *et al.*, 2007). En Aguascalientes se menciona a *Verticillium albo-atrum* como el causante de la marchitez del durazno (Ponce, 1973).

Síntomas

El hongo se ubica en los vasos del xilema, penetrando por las raíces más tiernas de las plantas, y obstaculiza el paso ascendente del agua y sales, consecuentemente la planta empieza por mostrar un marchitamiento, amarillamiento y secamiento de hojas. La infección puede ocurrir en algunos sectores del sistema vascular, por lo que los síntomas se pueden presentar inicialmente sólo en una rama o en un lado del árbol. Los daños se inician en las partes bajas de las ramas afectadas y se agudizan durante el verano. Al cortar dichas ramas se pueden observar los daños en los haces vasculares como un círculo interno de color café. Posteriormente todo el árbol muere. Generalmente los árboles menores de 3 años son más susceptibles. Los síntomas son más claros en épocas secas, aunque la diseminación es aparentemente más rápida en épocas de lluvias. Los árboles vigorosos pueden

recuperarse si existen cerca zonas de suelo libres del patógeno o si la cantidad de inóculo es baja (Pérez, 1990; Sotomayor, 1997).

Características morfológicas de dos especies

V. dahliae inicialmente produce un micelio hialino, que se hace floculoso y blanco, blanquecino a crema en el dorso (parte inferior) después de una semana, y que poco a poco se oscurece con la formación de micro esclerocios negros (inmersos) de paredes gruesas que miden 15 a 50 (hasta 100) μm en diámetro. Los cultivos maduros, cuando son vistos por el dorso, son de color crema, y parduzco a negro después de dos a tres semanas por la formación de un micelio oscuro. Son frecuentes sectores blancos en colonias de micelio gris. Los conidióforos son abundantes, erectos, hialinos y verticiliadamente ramificados, con tres a cuatro fiálides (16-35 x 1-2.5 μm) que surgen en cada nudo. Los conidios (2.5-8 x 1.4-3.2 μm), se presentan individualmente en los ápices, son elipsoidales a irregularmente subcilíndricos, hialinos y unicelulares (CAB International, 1998; Gubler, 2000).

V. albo-atrum por el contrario, produce conidióforos que están oscurecidos en la base, con fiálides de 20-30 (-50) x 1.4-3.2 μm . Los conidios, aunque similares en forma, son generalmente mayores, midiendo 3.5-10.5 (hasta 12.5) x 2-4 μm . El hinchamiento entre los septos del micelio restante se traduce en una apariencia torulosa, pero no se producen los microsclerocios. La diferencia entre las dos especies radica en que *V. albo-atrum* no produce microesclerocios (Romero, 1993; CAB International, 1998).

Los frutales de hueso comúnmente afectados por esta enfermedad son albaricoquero, ciruelo, cerezo dulce y agrio, duraznero, y nectarino; y portainjertos (Pérez, 1990; Sotomayor, 1997).

Ciclo de la enfermedad y epidemiología

Se encuentra ampliamente distribuido en los suelos húmedos de las regiones templadas donde sobrevive tanto en plantas silvestres como en cultivadas, principalmente entre los 0 y 30 cm de profundidad. Su desarrollo aparece a 21-27° C (óptimo 24° C). El pH del suelo tiene poco efecto en el desarrollo de la enfermedad en valores que varían de 4.4 a 6.7. En algunos cultivos, la deficiencia nutricional agrava la enfermedad (Howell, 1973; Pérez, 1990).

V. dahliae puede ser diseminado de muchas formas, que pueden ser por plantas enfermas que son transplantadas, suelos dispersados por el viento y herramientas de trabajo. Después de la introducción en el suelo, el patógeno puede persistir como esclerocio latente, o puede incrementar el número de esclerocios infectando a otros cultivos o malezas hospedantes (Hanison y Clare, 1970; Howell, 1973).

1.2.1.5. Podrición de la raíz [*Rosellinia necatrix* Prill. (anamorfo *Dematophora necatrix* R. Hartig)]

La podrición de la raíz por *Rosellinia*, también conocida como podrición blanca de la raíz, es una grave enfermedad de muchos frutales deciduos en la mayoría de las regiones templadas y subtropicales (Terai, 2000).

En México, en la región sur del Estado de México, específicamente en los municipios de Almoloya de Alquisiras, Coatepec Harinas y Temascaltepec, se reporta como uno de los principales patógenos (el otro es *Armillaria mellea*) causando enfermedades de raíz en durazno. De muestras de árboles con problemas de pudriciones de raíz se identificó a *Rosellinia necatrix* en 38.02% (Elías *et al.*, 2007).

Síntomas

Los síntomas en la parte aérea del árbol incluyen amarillamiento prematuro del follaje y pobre crecimiento de una o todas las ramas y nuevos brotes en primavera, además de muerte de ramitas. Las hojas son pequeñas y casi blancas, y se puede presentar cierta defoliación prematura. El fruto deja de crecer y se puede marchitar o caerse (Sztejnberg y Madar, 1980).

El síntoma subterráneo característico es la pudrición de las raíces fibrosas y formación de una capa blanquecina de micelio que después invade las raíces mayores. La invasión se extiende a través del córtex (zona de la raíz con funciones de almacenamiento de agua y nutrientes) y cambium y después sube al tronco. Ocasionalmente, el hongo rompe la corteza y se extiende al suelo adyacente. Las alfombrillas bien definidas y en forma de abanico del micelio, con filamentos blanquecinos y tramosos, pueden aparecer cuando se quita la capa exterior de la corteza muerta (Sztejnberg, 1990).

Los árboles infectados pueden morir muy rápidamente o deteriorarse durante varios años. Aunque los árboles se infectan poco después de la plantación, los síntomas agudos normalmente no aparecen hasta que empiezan a dar fruto. Los árboles con síntomas crónicos llevan frecuentemente más yemas florales que foliares el año antes de morir (Sinclair *et al.*, 1987)

Características morfológicas

La fase sexual produce un peritecio ostiolado que raramente se encuentra en la naturaleza. Los peritecios son esferoidales y negros, y se producen en una costra micelial. Las ascas son cilíndricas (250-380 x 8-12 μm) y las ascosporas (30-50 x 5-8 μm) son unicelulares (CAB International, 1998).

En la fase asexual produce micelio compuesto por hifas lisas y otras con

hinchamientos piriformes a nivel de los septos, características distintivas de diagnóstico. Conidióforos ramificados, pueden ser de longitud diferente, y revestidos de esporas en casi toda su extensión y que surgen de los esclerocios. Conidios pequeños, hialinos, unicelulares (3-4.5 x 2-2.5 µm) en conidióforos ramificados. El hongo produce microsclerocios (98 x 130 µm) negros y dispersos que tienden a unirse y formar capas microsclerociales (Sivanesan y Holliday, 1972; Romero, 1993).

Ciclo de la enfermedad

Los datos sobre la epidemiología son escasos en las áreas de cultivo de frutales de hueso. *R. necatrix* puede sobrevivir durante varios años en raíces podridas en la tierra y ocasionalmente como micelio o microsclerocios libres en el suelo o adheridos a desechos de la raíz. Las ascosporas se producen tan raramente que tienen poca importancia como inóculo. La viabilidad de los conidios es baja; la infección tiene lugar primariamente desde el micelio, que ataca las raíces finas y entra aparentemente por penetración directa. Las hifas se ramifican libremente en el córtex (tejido de almacenamiento de agua y nutrientes) destruyéndolo cuando crecen hacia las raíces mayores. El patógeno se extiende por crecimiento micelial a través del suelo e infecta las raíces de los árboles adyacentes. El suelo infestado y los trozos de raíces muertas pueden ser distribuidos por labores mecánicas o en las plantas de vivero. El hongo se desarrolla más rápidamente en suelos fríos y húmedos (Sivanesan y Holliday, 1972; Sinclair *et al.*, 1987).

1.2.1.6. Podrición violeta de la raíz (*Helicobasidium mompa* Tanaka)

El patógeno de la podrición violeta de la raíz es endémico en Japón y otros países como Corea y China y afecta a una amplia gama de frutales de hueso. En Japón se han identificado 113 especies en 50 familias de plantas hospedantes. La enfermedad produce pérdidas importantes de cosecha en

Japón (Sawamura, 2000).

Síntomas

Las partes aéreas de los árboles afectados muestran síntomas similares a los de otras enfermedades que afectan a las raíces (por ejemplo, podrición de la raíz por *Rosellinia*) Estos síntomas son: crecimiento reducido del brote, hojas pequeñas de color verde claro, muerte súbita de ramitas y brotes; y gradual deterioro de todo el árbol. La superficie afectada de la raíz de un árbol infectado se cubre con una red de micelio púrpura o pardo oscuro. El crecimiento micelial es muchas veces denso y se puede extender desde las raíces hasta el área del tronco próxima a la superficie del suelo. Los cuerpos fructíferos del hongo (basidiocarpos) se forman en otoño alrededor del tronco en la línea del suelo. Las raíces infectadas finalmente se pudren y desintegran (Araki, 1967; Harada y Segawa, 1990).

Características morfológicas

El basidiocarpo (fase sexual) es orbicular u oblongo, a menudo irregularmente lobulado, de 5-10 cm de diámetro y 2-4 cm de grueso, aterciopelado, al principio maleable y después subcoriáceo, a veces convexo, incrustado, pardo púrpura. El himenio es blanco con basidios curvados, que tienen uno a tres septos, y las basidiosporas (10-12 x 5-7 μm) son producidas en esterigmas alargados, y son ovoides, curvadas y hialinas (Araki, 1967; Harada y Segawa, 1990).

1.2.1.7. Secazón o muerte repentina (complejo *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* sp. y *Fusarium* spp.)

En Venezuela se reporta un problema de muerte de durazneros conocida localmente como secazón o muerte repentina. Aún cuando la causa o etiología de esta enfermedad no ha sido del todo esclarecida, los aislamientos de raíces y suelo de plantas con decaimiento han revelado consistentemente la presencia

de los hongos *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* sp. y *Fusarium* spp. generalmente asociados con nematodos del género *Meloidogyne*, el cual es uno de los géneros más ampliamente difundido en el país (Suárez *et al.*, 1999; Aponte *et al.*, 2001).

Los síntomas de la enfermedad por el complejo fungoso mencionado, consisten en una pudrición seca y muerte de las raíces, acompañadas por un amarillamiento del follaje, pérdida de turgencia (flacidez) de las hojas y secamiento de las ramitas, con una muerte súbita de la planta. El amarillamiento de las hojas también se asocia con la carencia de macronutrientes en la planta, aunque existe disponibilidad de los mismos en el suelo.

Una sintomatología similar fue observada en Georgia, USA, habiéndose señalado los mismos tres patógenos como agentes principales (asociados) del decline o muerte repentina de las plantas (Hine, 1961; Chandler *et al.*, 1962; Hendrix y Powell, 1970).

La dispersión de esta enfermedad se realiza principalmente por la siembra de plantas infectadas procedentes de viveros que no esterilizan el suelo, y por el uso y transporte de herramientas u otros utensilios infestados de un sitio a otro. Se presume que la perpetuación de los patógenos se efectúa por medio de estructuras de resistencia (clamidosporas y oosporas) que se desarrollan en las raíces y suelos contaminados por esos hongos. También se pueden mantener durante un menor tiempo en estado micelial en las raíces y en los suelos colonizados (Hine, 1961; Rondón, 1990).

1.2.1.8. *Fusarium* spp. en durazno

En una revisión exhaustiva de las bases de datos internacionales, con licencia de la biblioteca del Colegio de Postgraduados: CAB DIRECT (1973-2007) y

Biological Abstrac (1926-2007) se encontraron reportes de *Fusarium* spp. en varios países a nivel mundial, pero no en México (Cuadro 1.4).

Además de Estados Unidos y Venezuela, donde se reportó a *Fusarium* spp. como uno de los causantes (aunque no se mencionan pruebas de patogenicidad) de la secazón o muerte repentina del duraznero (Hine, 1961; Rondón, 1990) se reportan varias especies de *Fusarium* atacando al cultivo en otros países a nivel mundial.

Se señaló a *F. oxysporum* en asociación con especies de nematodos como *Criconemoides xenopla*, *Hoplolaimus galeatus*, *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus vulnus* y *Tylenchorhynchus claytoni*, afectando el crecimiento de plántulas de durazno en invernadero en Estados Unidos (Wehunt y Weaver, 1972).

Cuadro 1.4. Especies de *Fusarium* reportadas en duraznero y otros frutales de hueso.

Especie	Síntomas	Patogenicidad (comprobada o asociados)	País	Referencias
Duraznero				
<i>Fusarium</i> spp.	Secazón y muerte repentina	Asociado	Venezuela	Aponte <i>et al.</i> , 2001; Suárez <i>et al.</i> , 1999; González, 1993; Rondón, 1990.
<i>Fusarium</i> spp.	Pudrición seca y muerte de raíces, amarillamiento del follaje y secamiento de ramitas.	Asociado	EUA.	Hine, 1961; Chandler <i>et al.</i> , 1962; Hendrix y Powell, 1970.
<i>F. oxysporum</i>	Afecta crecimiento en plántulas (invernadero).	Asociado	EUA.	Wehunt y Weaver, 1972.
<i>F. solani</i> y <i>F. oxysporum</i>	Afectación en el crecimiento	Patogenicidad comprobada	EUA.	Nyczepir y Pusey, 1986.
<i>Fusarium</i> sp.	Necrosis de raíces secundarias	Patogenicidad comprobada	EUA.	Nyczepir y Lewis, 1984.
<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	Pudrición de raíz, canchros en el tallo, muerte regresiva y gomosis.	Asociados	Puerto Rico	Rodríguez y Hernández, 2004.
<i>F. oxysporum</i>	...	Patogenicidad comprobada.	Brasil	Corazza y Chilos, 1986.
<i>F. lateritium</i>	Canchros y muerte descendente	Asociados	Hungría	Rozsnyay <i>et al.</i> , 1992.
<i>F. avenaceum</i>	Lesiones necróticas	Patogenicidad comprobada	Nueva Zelanda	Hartill y Broadhurst, 1989.
<i>Fusarium</i> sp.	Atacando ramas	Asociado	Francia	Jailloux y Froidefond, 1979.

<i>F. oxysporum</i>	Pudrición de raíces	Asociado	Rusia	Namoradze, 1973; Namoradze, 1975;
<i>F. solani</i> <i>Fusarium</i> sp.	Decline en plántulas Corteza verrugosa y gomosis en ramas	Asociado Asociado	Egipto China	Abdou <i>et al.</i> , 1982. Wu <i>et al.</i> , 1982.
<i>F. equiseti</i>	--	Asociado	--	Booth, 1978.
Otros frutales de hueso				
<i>F. lateritium</i> y <i>F. solani</i>	Muerte regresiva de ramitas, cancros.	Asociados	EUA.	Sinclair <i>et al.</i> , 1987.
<i>F. avenaceum</i> , <i>F. gibbosum</i> <i>F. oxysporum</i> , <i>F. semitectum</i> ,	Pudrición de raíces, marchites.	Asociados	República de Georgia (Asia)	Dzagnidze y Purtseladze, 1979.
<i>F. solani</i> var. <i>argillaceum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. sambucinum</i> , (<i>F. equiseti</i>) y <i>F. verticillioides</i>				
<i>Fusarium</i> spp.	--	Asociado	Turkía	Sipahioglu <i>et al.</i> , 2006.

En huertos comerciales de Estados Unidos con historial de vida corta del duraznero se reportó como ordinaria la presencia de *Pythium* y *Fusarium* en necrosis de raíces secundarias de durazno, la severidad fue mayor con la presencia del nematodo *Criconemella xenoplax* (Nyczepir y Lewis, 1984).

Fusarium solani y *F. oxysporum* se inocularon en asociación con el nematodo *Criconemella xenoplax* en invernadero y resultó en sinergismo en la necrosis de raíces y efectos en el crecimiento de las plantas de durazno en Estados Unidos (Nyczepir y Pusey, 1986).

En Puerto Rico se aisló e identificó a *Fusarium solani* y *F. oxysporum* asociados a pudrición de raíz, canchros en el tallo, muerte regresiva de ramas y gomosis. No se indicó comprobada la patogenicidad (Rodríguez y Hernández, 2004).

En Brazil se inoculó en patrones de durazno a *F. oxysporum* y *Verticillium dahliae* y se reaislaron consistentemente de plantas infectadas (Corazza y Chilosi, 1986).

En Hungría se mencionó la presencia de *F. lateritium* asociado a canchales y muerte descendente, en asociación con *Cytospora* spp. Se evaluó el control biológico de estos patógenos *in vitro* e *in vivo* (Rozsnyay *et al.*, 1992).

En Nueva Zelanda se ha confirmado la patogenicidad de *Fusarium avenaceum* en durazno y nectarino (Hartill y Broadhurst, 1989).

En Francia se aisló a *Fusarium* de ramas, asociado con *Aureobasidium*, *Cladosporium* y *Fusicoccum amygdali*. Se probó el control de estas especies pero no se señaló la realización de pruebas de patogenicidad (Jailloux y Froidefond, 1979).

En Rusia se reportó a *F. oxysporum* como agente causal de la pudrición de raíces, y la influencia de la temperatura en el crecimiento de diferentes especies de *Fusarium* aisladas de raíz de durazno (Namoradze, 1973, 1975).

En Egipto se identificó a *Fusarium solani*, asociado con *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* causando decline de plántulas de frutales de hueso pero fue más afectado el durazno, debido a las lluvias que favoreció una alta incidencia por la humedad del suelo y baja temperatura en el mes de noviembre. Se evaluó la incidencia pero no se realizaron pruebas de patogenicidad (Abdou *et al.*, 1982).

En otro estudio realizado en China, se señaló que se aisló *Fusarium* sp. además de *Macrophoma* y *Alternaria* en durazneros con síntomas de corteza verrugosa y gomosis en ramas, pero al inocularlos no se demostró la patogenicidad de *Fusarium* sp. sólo de *Macrophoma* (Wu *et al.*, 1982).

1.2.1.9. *Fusarium* spp. en otros frutales de hueso

Booth (1978) enlistó a un amplio rango de hospedantes de *F. equiseti*, entre ellos al género *Prunus* (no se mencionan especies).

En la República de Georgia (Asia Occidental), se aisló de raíz y cuello de frutales de hueso a 12 agentes causales de pudrición de raíces, debilitando plántulas y causando marchites. Las especies de *Fusarium* fueron: *F. avenaceum*, *F. gibbosum* (*F. equiseti*), *F. oxysporum*, *F. sambucinum* (*Gibberella pulicaris*), *F. semitectum*, *F. solani*, *F. solani* var. *argillaceum*, y *F. verticillioides* var. *subglutinans* (*G. fujikuroi*). Los 4 restantes corresponden a *Rosellinia necatrix*, *Sclerotium bataticola* (*Macrophomina phaseolina*), *Rhizoctonia* (*Moniliopsis*) *aderholdii* y *Pestalotia hartigii* (Dzagnidze y Purtseladze, 1979).

En Turquía, además de virus y viroides, se obtuvieron aislamientos de los hongos *Fusarium* spp. asociados a *Armillaria mellea*, *Chondrostereum purpureum*, *Cytospora* spp., *Monilinia laxa*, *Phytophthora* spp. *Rosellinia* spp. y *Stigmata carpophila*, de muestras sintomáticas de la región. Estas especies se identificaron como patógenos por técnicas moleculares, asociados a enfermedades de frutales de hueso (Sipahioğlu *et al.*, 2006).

1.2.1.10. *Gliocladium* spp.

En la República de Georgia se registró a *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Cytospora*, *Gliocladium*, *Phialophora* y *Verticillium* causando muerte regresiva en durazno, ciruelo y pera. Estas especies se asociaron como los más dañinos en árboles frutales en ese país (Kanchaveli, 1997).

G. roseum causa alteraciones en el contenido de azúcares y compuestos fenólicos en frutos de durazno y pera en poscosecha en Rusia (Sumbali y Mehrotra, 1981).

Otros frutales de hueso

En Rusia se aisló a *Gliocladium roseum* de raíces y tallo, el cual se asocia a destrucción de tejidos de la corteza, necrosis, gomosis y obstrucción de vasos conductores en plántulas de cereza (*Prunus avium*) (Tsakadze y Kanchaveli, 1979).

En la India se reportó a *G. roseum* en asociación con *Acremonium diospyri*, *F. oxysporum* f. sp. *psidii*, *F. solani* (*Nectria haematococca*), y *Macrophomina phaseoli* (*M. phaseolina*), causando marchitez en Guayaba (Negi *et al.*, 2001) y atacando manzana (Sumbali *et al.*, 1980).

1.3. CARATERIZACIÓN MOLECULAR

La técnica más usada es la rDNA-ITS (Internal transcribed spacer). Los genes nucleares ribosomales 18S, 5.8S, y 28S son altamente conservados, y se encuentran unidos internamente por las regiones: ITS1 y ITS2. La amplificación de estas regiones, incluyendo todo el gen 5.8S y las regiones adyacentes de los otros dos genes es por PCR con primers Universales, y secuenciación del producto (White *et al.*, 1990).

La secuencia de nucleótidos de las regiones ITS permite caracterizar molecularmente a los hongos a nivel de género y a nivel de especie, por alineación con las secuencias depositadas en el Banco de Genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Aunque en algunos casos, especies morfológicamente muy similares pudieran

tener idéntica secuencia de la región amplificada. La secuencia de cualquiera de las dos regiones ITS de una especie caracterizada, se puede emplear para diseñar primers específicos que permiten la identificación molecular de esa misma especie en los tejidos del hospedante o substrato, sin tener que realizar previamente el aislamiento del hongo en cultivo puro, como tradicionalmente se ha venido haciendo basándose principalmente en la morfología del hongo. Actualmente con este análisis molecular por PCR se facilita la identificación del hongo a nivel género y especie en un menor tiempo, de tal manera que nos permite reconfirmar o ampliar la información del hongo a nivel genético (Yáñez, 2001).

1.4. CONDICIONES CLIMATOLÓGICAS Y SUELO EN LA REGIÓN DE ESTUDIO

Clima. En la región de Ocuituco y Tetela del Volcán, Morelos el clima es Cb (m) (w) ig, templado con verano fresco y largo, la temperatura media anual entre 12 y 18 °C (el mes más frío de 3 a 18 °C, y el mes más caliente de 6.5 a 22 °C) con oscilación isothermal menor de 5°; el régimen de lluvias es de verano, y el mes más lluvioso es Julio (Cuadro 1.5) (García, 1988).

Cuadro 1.5. Promedios mensuales de temperatura y precipitación de la región de estudio*.

Mes	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)
Enero	15.9	18.1
Febrero	16.3	1.3
Marzo	18.0	9.3
Abril	19.4	70.5
Mayo	19.8	185.3
Junio	17.7	349.7
Julio	17.1	368.5
Agosto	17.3	367.6
Septiembre	17.1	322.3
Octubre	16.8	149.8
Noviembre	16.3	40.2
Diciembre	15.6	2.6
Anual	17.2	1,885.2

*García, 1988.

Suelo. Este es predominantemente andosol, originado de cenizas volcánicas, de formación reciente muy ligero, con alta capacidad de retención de agua y nutrientes, y susceptible a la erosión. También existen en menor grado, suelos de tipo regosol y litosoles (INEGI, 2005).

1.5. LITERATURA CITADA

- Abbruzzetti, G. 1997. Withered and cankerous branches a widespread disease of peach. *Terra e Sole* 52:91-94.
- Abdou, Y. A., O. M Mousa, and A. M Abd-El-Malek. 1982. Studies on seedling decline of stone fruits. *Egyptian Journal of Phytopathology* 14: 93-102.
- Aceves, R. J. y D. O Téliz. 1984. Enfermedades del durazno (*Prunus persica* (L) Batsch) en Tétela del Volcán, Morelos. *Agrociencia* 65: 121-128.
- Agrios, N. G. 2005. *Plant Pathology*. Fifth edition. Editorial Limusa. 922 p.
- Agustí, M. 2004. *Fruticultura*. Ediciones Mundi-Prensa. pp: 273-277.
- Anderson, J. B. 1986. Biological species of *Armillaria* in North America: Redesignation of groups IV and VI and enumeration of voucher strains for other groups. *Mycologia* 78:837-839.
- Aponte, A., A. Rondón, Z. Suárez, M. López, y R. Solórzano. 2001. Etiología y manejo integrado de la secazón o muerte repentina del duraznero en Aragua y Miranda. In: *Memorias del XII Congreso Venezolano de Fitopatología*. Maracay, 14-16 de noviembre. p.79.
- Araki, T. 1967. Soil conditions and the violet and white root rot diseases of fruit trees. *Bull. Nal. Inst. Agrie. Sci. Ser. C*. 21:1-109.
- Arnal, E., F. Godoy, y A. Rondón. 1982. Contribución al conocimiento de insectos de importancia agrícola. In: *Memorias del VII Congreso Venezolano de Entomología*. Maturín, 11-15 Julio. (Resúmenes, p. 20).

- Barnett, L. H., and B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Booth, C. 1978. *Fusarium equiseti*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1978, No. 58. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra.
- Browne, G. T., y S. M. Mircetich. 2000. Podredumbres de la raíz y de la corona por *Phytophthora* (*Phytophthora* Root and Crown Rots). In: The American Phytopathological Society. Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, y J. K. Uyemoto (Eds.). pp: 38-40.
- CAB Internacional. 1998. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 255-256. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra.
- Chandler, W. A., J. H. Owen, and R. L. Livingston. 1962. Sudden decline of peach in Georgia. Plant Disease Reporter. 46 (2): 831-834.
- Coletto, M., J. M. 1995. Crecimiento y desarrollo de las especies frutales. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp: 21-29.
- Corazza, L., Chilosi, G. 1986. Behaviour of some stone fruit rootstocks towards *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale 11: 113-116.
- De la Torre, A. R. 1985. Evaluación de daños por enfermedades en el durazno en el DT. III, Cholula, Pue. In: Memorias del XII Congreso Nacional de Fitopatología. Guanajuato, Gto. (Resumen 182).
- Díaz, M. D. 2002. Fisiología de árboles frutales. AGT Editor. México. 390 p.

- Díaz, M. D., and J. Martínez. 1988. Peach production in Mexico. In: The peach. Norman, C. F. and S. B. Wayne (Eds.) Somerset Press, Inc. U.S.A. pp: 134-139.
- Domsch, K. H., W Gams, and T. H. Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Academia Press. London. 859 p.
- Dzagnidze, S. I., and Z. S. Purtseladze. 1979. Results of investigation of root rot of stone fruit seedlings in Georgia. Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruzinskoi SSR 30: 35-38.
- Elías, R. R., J. Reyes G., y M. J. Aquino. 2007. Identificación y propuesta de manejo de enfermedades de raíz del durazno en el sur del Estado de México. Fundación Salvador Sánchez Colín. Coatepec Harinas, Edo. De México.
- Fideghlli, C. 1987. El melocotonero. Ediciones Mundi-Prensa. España. 243 p.
- Flores, R. C., y C. B. Pinto. 1984. Enfermedades más importantes del durazno (*Prunus persica* L.) y del higo (*Ficus carica*) en el noroeste de Morelos. In: Memorias del XI Congreso Nacional de Fitopatología. San Luis Potosí, S.L.P. (Resumen 23): pp 27.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Tercera edición. UNAM. México. 252 p.
- Gil-Albert, V. F. 1989. Morfología y fisiología del árbol frutal. Vol I. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp: 17-35.

- González, R. H. 1993. Nemátodos Fitoparásitos. In: El Duraznero en Chile. INIA. Edit. Los Andes. pp: 239-251.
- Gubler, W. D. 2000. Marchitamiento por *Verticillium*. In: Plagas y enfermedades de los frutales de hueso. Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, y J. K. Uyemoto (Eds.). The American Phytopathological Society. p. 40-41.
- Hanison, A. F. and B. C. Clare. 1970. Host reactions involved in recovery of apricot trees from *Verticillium wilt*. Aust. J. Biol. Sci. 23:1027-1032.
- Harada, Y., and K. Segawa. 1990. Violet root rot. In: Compendium of Apple and Pear Diseases. A. L. Jones , H. S. Aldwinckle (Eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, M. pp: 52-53.
- Hartill, W. F. T., and P. G. Broadhurst. 1989. *Fusarium avenaceum* as a pathogen of stone fruit in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 17(3): 293-295.
- Haygood, R. A., C. H. Graves, and W. H Ridings. 1986. *Phytophthora* root rot and stem canker of peach trees in Mississippi. Plant Disease. 70:866-868.
- Hendrix, F. F., and W. M. Powell, 1970. Control of root pathogens in peach decline sites. Phytopathology. 60: 16-19.
- Hine, R. B. 1961. The role of fungi in the peach replant problem. Plant Disease Reporter. 45 (6): 462-465.
- Howell, C. R. 1973. Pathogenicity and host-parasite relationship. Proc. Work Conf. Nat. Conf. Pathol. 19:42-46.

- INEGI. 2005. Mapas Anuario Estadístico de Morelos. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México. 17 p.
- Jailloux, F., and G. Froidefond. 1979. Differential action of five fungicides on the fungal mycoflora of peach shoots and leaves. *Phytiatrie-Phytopharmacie* 28 (4): 215-226.
- Jailloux, F. 1985. Susceptibility of 27 peach varieties to *Fusicoccum amygdali* Del., causal agent of shoot canker. *Agronomie* 5(6): 515-520.
- Kanchaveli, Z. S. 1997. *Cylindrocarpon* dieback of fruit trees. *Zashchita i Karantin Rastenii* 10: 33.
- Lyda, S. D. 2000. Podredumbre de la raíz por *Phymatotrichum* (*Phymatotrichum* Root Rot). In: Plagas y enfermedades de los frutales de hueso. Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, y J. K. Uyemoto (Eds.). The American Phytopathological Society. pp: 41- 42.
- Mircetich, S. M. 1982. *Phytophthora* root and crown rot of apricot trees. *Acta Horticulture*. 121:385-396.
- Namoradze, I. I. 1973. The fungus *Fusarium* causing root rot of peach. *Trudy Instituta Zashchity Rastenii. Gruz. SSR* 24:240-243.
- Namoradze, I. I. 1975. Effect of different temperatures on the growth and development of *Fusarium* species isolated from the roots of peach. *Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruz. SSR* 27: 153-157.
- Negi, S. S., A. K Misra, and S. Rajan. 2001. Guava wilt. *Indian Journal of Horticulture*, 2001, Vol. 58, No. 1/2, pp. 145-151.

- Norman, C. F., and S. B. Wayne. 1988. The Peach. Somerset Press, Inc. U.S.A. 986 p.
- Nyczepir, A. P., and S. A. Lewis. 1984. Incidence of *Fusarium* and *Pythium* spp. in peach feeder roots as related to dibromochloropropane application for a control of *Criconemella xenoplax*. Plant Disease 68(6): 497-499.
- Nyczepir, A. P., and P. L. Pusey 1986. Association of *Criconemella xenoplax* and *Fusarium* spp. with root necrosis and growth of peach. Journal of Nematology 18: 217-220.
- Orozco, V. M. G. 1991. Principales enfermedades del durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch y su control. In: El cultivo del durazno. Memorias curso teórico – práctico. Uruapan, Mich. Colegio de Postgraduados. pp: 110 -125.
- Pérez, G. S. 1990. Manual para cultivar duraznero. Edit. Limusa. México. 108 p
- Pérez, G. S. 1995. Dinámica en la adopción de variedades de duraznero, ciruelo y albaricoque en México. Memorias de la primera Reunión nacional e internacional sobre producción de durazno, chabacano y ciruelo. Querétaro y Zacatecas. Universidad Autónoma de Querétaro. México. pp: 45-59.
- Ponce, F. 1973. Pudrición texana y otras enfermedades del durazno. Memorias de la Mesa Redonda sobre la problemática actual del duraznero en Aguascalientes. 1973. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 93 p
- Proffer, T. J., A. L Jones, and G. R. Ehret. 1987. Biological species of *Armillaria* Isolated from sour cherry orchards in Michigan. Phytopathology. 77:941-943.

- Rodriguez, A. J. 1988. The peach industry and breeding program, Central Mexico. In: The peach. Norman, C. F. and S. B. Wayne (Eds.) Somerset Press, Inc. U.S.A. pp: 140-141.
- Rodríguez, A. J., y B. Sherman W. 1995. Nuevas variedades de duraznos de pulpa firme para zonas subtropicales y de invierno moderado. In: Memorias de la primera Reunión Nacional sobre Producción de durazno, chabacano y ciruelo. Querétaro y Zacatecas, México. pp 72-75.
- Rodríguez, R., y E. Hernández. 2004. Mucor foliar spot and mycoflora in stem and root lesions of peach. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 88 (3-4): 155-160.
- Rom, R. C. 1988a. Peach taxonomy and nomenclature. In: The peach. Norman, C. F. and S. B. Wayne (Eds.) Somerset Press, Inc. U.S.A. pp: 132-133.
- Rom, R. C. 1988b. The peach: it's history and future. In: The peach. Norman, C. F. and S. B. Wayne (Eds.) Somerset Press, Inc. U.S.A. pp: 1-6.
- Romero, C. S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo 347 p.
- Rondón, A. 1990. Enfermedades de los frutales en Venezuela. Maracay. Ven, Instituto de Investigaciones Agronómicas, CENIAP-FONAIAP, 96 p (Serie B N° 9).
- Rozsnyay, Z. D., M Hevesi, Z. Klement, and L. Vajna. 1992. Biological control against canker and dieback diseases of apricots. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica Vol. 27: 551-556.

- Sawamura, K. 2000. Podredumbre violeta de la raíz (Violet Root Rot). In: Plagas y enfermedades de los frutales de Hueso. Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Ritchie D. f., Uriu, K., Uyemoto, J. k. (Eds.). The American Phytopathological Society. Ediciones mundi Prensa. 43 p.
- SEDEADRO (Secretaría de Desarrollo Agropecuario). 2002. Sistema de Información Agropecuaria . Cuernavaca, Morelos.
- Serizawa, S. 1984. Control of *Fusicoccum* canker of peach trees by fungicidal applications. Bulletin of the Shizuoka Prefectural Citrus Experiment Station, No. 20, pp. 45-51.
- Simental, R. V. M. 2004. El duazno: un negocio jugoso para los productores del estado de Morelos. Revista Claridades Agropecuarias. INFOASERCA. pp: 36-37.
- Sinclair, W. A., H. H Lyon, and W. T Jhonson. 1987. Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press. Japan. 574 p.
- Sivanesan, A., and P. Holliday. 1972. *Rosellinia necatrix*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. N° 352. Commonwealth Mycological Institutc, Kew, Surrey, Inglaterra.
- Sotomayor, S. C. 1997. El cultivo del duraznero. In: Chile Agrícola v. 22(229). Chile. pp: 386-389.
- Smith, M. L., J. N. Bruhn, and J. B. Anderson. 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. Nature 356:428-431.

- Sipahioglu, H. M., S. Demir, A. Myrta, M. Al-Rwahnih, B. Polat, L. Schena, M. Usta, A. Akkopru, M. Selcuk, A. Ippolito, and A. Minafra. 2006. Viroid, phytoplasma, and fungal diseases of stone fruit in eastern Anatolia, Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 34: 1-6, 28.
- Suárez, Z. C., A. Rosales, A. Aponte, A. Rondón, A. Bolívar y R. Crozzoli. 1999. Avances sobre la problemática fitopatológica del duraznero en el Municipio Tovar del estado Aragua. In: *Memorias del XVI Congreso Venezolano de Fitopatología*. Barquisimeto 14-18, noviembre. (Memorias, p 85).
- Sumbali, G., R. S. Mehrotra, and K .R. Aneja. 1980. *Gliocladium roseum* on apple from India. *Indian Phytopathology* 32:643.
- Sumbali, G., and R. S. Mehrotra. 1981. Influence of post-harvest fungal infections on the phenolic contents of apple, pear and peach fruits. *National Academy Science Letters*, 4(10): 393-396.
- Sztejnberg, A. 1990. *Rosellinia (Dematophora)* root rot. In: *Compendium of Apple and Pear Diseases*. A. L. Jones y H. S. Aldwinckle (Eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN. pp: 46-47.
- Sztejnberg, A., and Z. Madar. 1980. Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white root rot disease in fruit trees. *Plant Dis.* 64:662-664.
- Terai, Y. 2000. *Rosellinia (Dematophora)* Root Rot. In *Plagas y enfermedades de los frutales de hueso*. The American Phytopathological society. Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, y J. K. Uyemoto (Eds.). Ediciones Mundi Prensa. pp: 42-43.

- Tsakadze, T., and S. Kanchaveli. 1979. *Gliocladium roseum* (Link.) Bain, the pathogen of withering of cherry. Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruzinskoi SSR 30: 24-29.
- Yañez-Morales, M. J. 2001. Molecular and morphological analyses of *Alternaria* and *Stemphylium* from onion. Ph. D. Tesis Doctoral. Cornell University. Ithaca, NY. USA. 263 p.
- Wehunt, E. J., and D. J. Weaver. 1972. Effect of nematodes and *Fusarium oxysporum* on the growth of peach seedlings in the greenhouse. Journal of Nematology 4(4): 236
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322 pp. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA.
- Wilcox, W. F., and M. A. Ellis. 1989. *Phytophthora* root and crown rots of peach trees in the esatern Great Lakes region. Plant Disease 73:794-798.
- Wilcox, W. F., and S. M. Mircetich. 1985. Effects of flooding duration on the development of *Phytophthora* root and crown rots of cherry. Phytopathology 75:1451-1455.
- Wu, Y. Q., Y. R. Wu, and L. Y. Chen. 1982. A preliminary study of peach warty bark. Shanghai Agricultural Science and Technology 5: 29-30.
- Zegbe, D. J., J. C Mena., A. R. Rumayor, L. T. Reveles, y G. Medina. 2005. Prácticas culturales para producir durazno criollo en Zacatecas. Instituto

Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Zacatecas. Publicación especial No. 15. 82 p.

Fuentes en Internet:

FAOSTAT (2004 y 2005):

<http://www.faostat.fao.org/faostat/form?colletion=production.crops.primary&domain>

SIACON (2004):

<http://www.siea.sagarpa.gob.mx/sistemas/siacon/SIACON.html>

INEGI (1999):

<http://www.inegi.gob.mx>

INFOASERCA (2000, 2002):

<http://infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/088/ca088.pdf#page=1>

<http://infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/127/ca127.pdf#page=36>

CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE HONGOS AISLADOS DE DURAZNERO DEL ESTADO DE MORELOS

2.1. INTRODUCCION

El interés en este trabajo de investigación surgió en un viaje académico en el 2006 del curso de Hongos Fitopatógenos del programa de Maestría en Protección Vegetal de la Universidad Autónoma Chapingo, a la región duraznera ubicada al norte del estado de Morelos, en donde los responsables del mismo (Dr. Marcelo Acosta Ramos y M.C. Francisco Ponce González), señalaron como un problema fitosanitario la muerte de durazneros por un agente desconocido, o que no concuerda con las características de los patógenos conocidos en este cultivo. Los síntomas observados fueron: muerte descendente de ramas, amarillamiento, marchitez y muerte de árboles.

Con estos antecedentes se planteó como objetivos la: Identificación y caracterización del o los agentes causales de la enfermedad.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

FASE DE CAMPO

2.2.1. Localización del área de estudio

La zona de estudio comprendió los municipios de Ocuilco y Tetela del Volcán en el estado de Morelos.

Ocuilco se localiza en la región Oriente-Norte del Estado de Morelos. La cabecera municipal se encuentra a una distancia de 66 km al Este de la ciudad de Cuernavaca (capital). Geográficamente se localiza entre los paralelos

18°52'3" de latitud Norte y los 98° 46' de longitud Oeste respecto del meridiano de Greenwich. Limita al norte con el Estado de México, al sur y sureste con el Municipio de Zacualpan de Amilpas, al Este con Tetela del Volcán y al Oeste y sur con Yecapixtla (Figura 2.1).

Tetela del Volcán se localiza al noreste del Estado y se ubica geográficamente entre los paralelos 18° 57' de latitud Norte y los 98° 14' de longitud Oeste del meridiano de Greenwich, a una altura de 2,040 metros sobre el nivel del mar. Tiene una superficie de 124,092 km², cifra que representa el 2.50 % del total del estado. Limita al norte con el Distrito Federal, al sur con Tlayacapan, al este con Totolapan y al oeste con Tepoztlán (Figura 2.1).

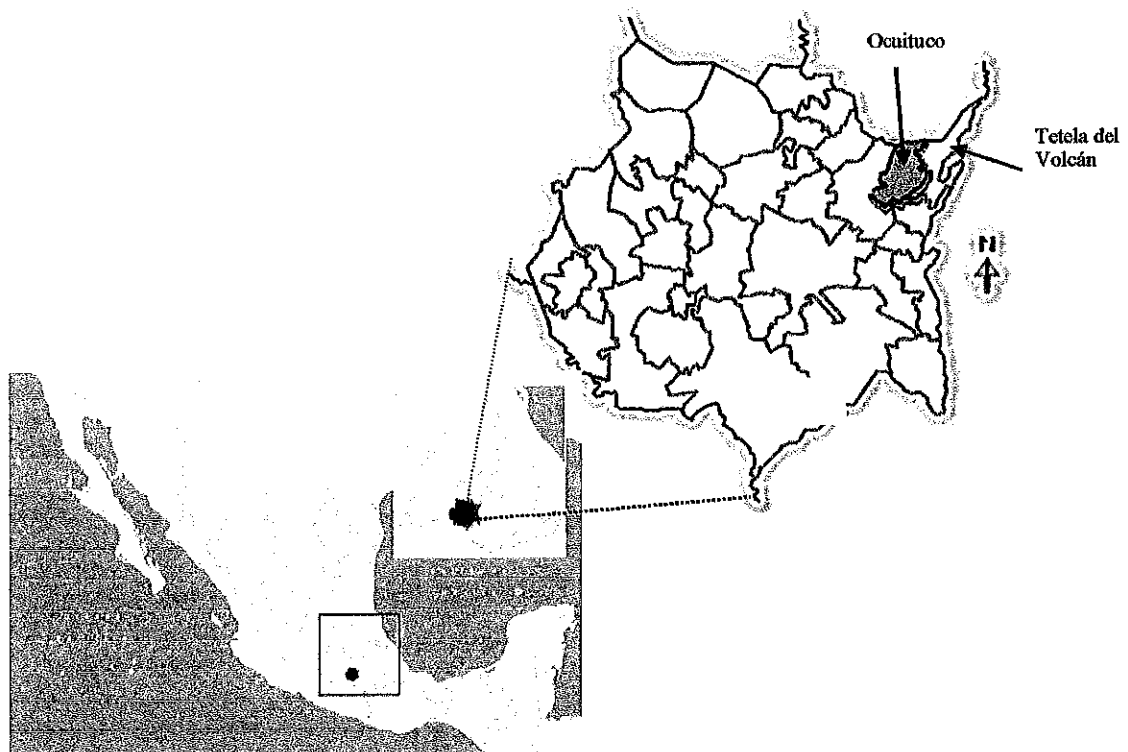


Figura 2.1. Localización geográfica de los municipios de Ocuiluco y Tetela del Volcán, Morelos. Fuente: EMM, 2005; INEGI, 2005.

2.2.2. Sitios de muestreo

Los huertos seleccionados fueron 13 (siete en Tetela del Volcán y seis en Ocuituco). Las unidades de muestreo (árboles) con síntomas de marchites y muerte, fue un árbol por huerto (Cuadro 2.1).

2.2.3. Características de los huertos seleccionados

Se diseñaron formatos de campo (Anexo 2.1) y en cada recorrido de campo se entrevistó a los productores en cada huerto sobre información de las características físicas y de manejo agronómico de los huertos para conocer: la edad de los huertos, etapa fenológica, órgano o parte de los árboles dañados, variedad y patrones, densidad de siembra, riego, fertilización, y control químico de patógenos.

Se tomó muestras de suelo de los 13 huertos, de las cuales se hizo una muestra compuesta para su análisis en el Laboratorio Central Universitario del Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Chapingo.

2.2.4. Fechas de muestreo

Se realizaron muestreos en cuatro fechas: 24 de marzo, 24 de junio, 2 de septiembre del año 2006; y febrero de 2007.

2.2.5. Evaluación de la incidencia

Se evaluó el porcentaje de incidencia de la enfermedad en los huertos seleccionados, considerando árboles con síntomas iniciales, intermedios y avanzados. Los síntomas de cada uno se describirán en resultados.

Para la evaluación se utilizó la fórmula:

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de árboles enfermos}}{\text{Número total de árboles de la muestra}} \times 100$$

En resultados se dirá el número total de árboles por huerto para aplicar esta fórmula que es una regla de tres simple.

2.2.6. Colecta y manejo de muestras vegetales

De cada árbol se colectaron muestras de:

- a) Raíz (primaria y secundarias): a diferentes profundidades respecto a la base del tronco.
- b) Corona: tallo basal
- c) Tallo (tronco y ramas) (Figura 2.2 y 2.3) con necrosamiento interno y pudrición (Cuadro 2.1).

Cada muestra se etiquetó y trasladó al laboratorio.

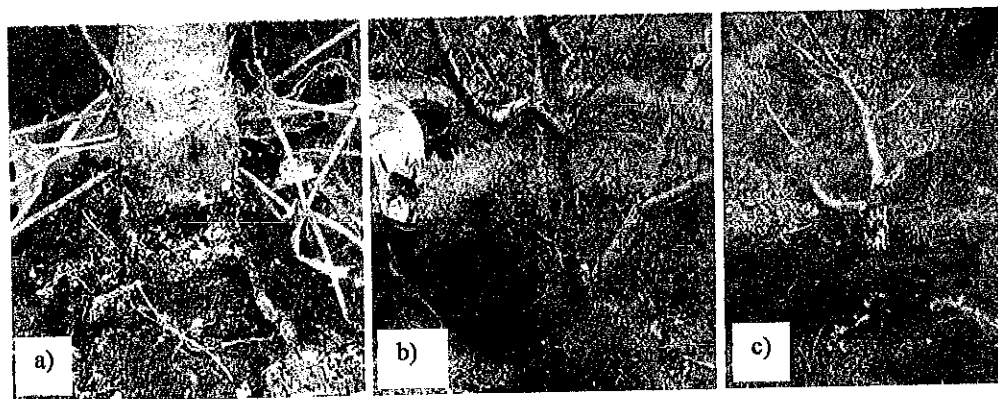


Figura 2.2. Toma de muestras de raíz principal y secundarias a diferentes profundidades. a) Raíces superficiales (0-15 cm), b) de 15-30 cm, y c) de 15 a 40 cm

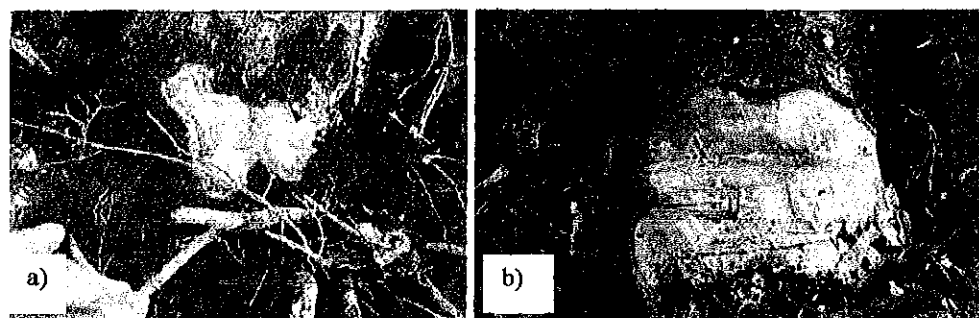


Figura 2.3. Toma de muestras de la corona y tallo. a) Corona, b) Tallo.

Cuadro 2.1. Fechas de colecta y tipo de muestra, en 13 huertos de los municipios de Tetela del Volcán y Ocuiluco, Morelos.

No. y fecha de muestreo	Parte del árbol	Origen de la muestra	No. de huerto	No. de Árbol	Edad del árbol (años)	Muestra	Profundidad o altura (cm)
<u>24/Mar/06</u>	Raíz						
1		Tetela	1	1	7	superficial	0-15
2	"					secundaria	15-40
3	"	Tetela	2	2	10	superficial	0-15
4	"	Tetela	3	3	10	superficial	0-15
5	"	Ocuiluco	1	4	7	secundaria	0-15
6	"					terciaria	15-40
<u>24/Jun/06</u>	"	Ocuiluco	2	5	7	secundaria	0-15
7	"					terciaria	15-40
8	"						
9	"	Ocuiluco	3	6	10	secundaria	0-15
10	"					terciaria	15-40
<u>2/Sep/06</u>	"	Ocuiluco	4	7	3	absorbentes	10
11	"					primaria	35
12	"					secundaria	15
13	"						
14	"	Tetela	4	8	15	Raíz-corona	0-15
15	"					secundaria	15-40
<u>3/Feb/07</u>	"	Ocuiluco	5	9	10	absorbente	10 -20
16	"					secundaria	15-40
17	"					terciaria	15-40
18	"					cuarta	15-40
19	"	Ocuiluco	6	10	7	absorbente	10-20
20	"					secundaria con corteza	15 -40
21	"						
22	"					primaria con corteza	15-40
23	"					primaria sin corteza	10
24	"	Tetela	5	11	4	Sólo corteza de raíz.	0-10
25	"					absorbente	15-30
26	"					secundaria sin corteza	20-40
27	"					terciaria con corteza	20-40

28	Raíz					terciaria sin corteza	20-40
29	"	Tetela	6	12	6	secundaria sin corteza	15-30
30	"					secundaria con corteza	15-30
31	"					terciaria sin corteza	20-40
32	"					terciaria con corteza	20-40
33	"	Tetela	7	13	4	secundaria solo corteza	15-30
34	"					secundaria sin corteza	15-30
35	"					terciaria con corteza	20-40
36	"					terciaria sin corteza	20-40
<u>24/Mar/06</u>							
37	Corona	Tetela	1	1	7	Sin corteza	0-15
<u>2/Sep/06</u>							
38	"	Ocuituco	4	2	3	Sin corteza	5
39	"	Tetela	4	3	15	Sólo corteza	0 -15
<u>3/Feb/07</u>							
40	"	Ocuituco	6	4	7	Sin corteza	0 -10
41	"					Con corteza	0-10
<u>24/Mar/07</u>							
42	Tallo	Tetela	1	5	7	T (tallo)	150
<u>24/Jun/06</u>							
43	"	Ocuituco	1	6	7	T	100
44	"	Ocuituco	2	7	7	T	150
45	"	Ocuituco	3	8	10	T	200
<u>2/Sep/06</u>							
46	"	Ocuituco	4	9	3	T	10
47	"					T	30
48	"	Tetela	4	10	15	T	150
<u>3/Feb/07</u>							
49	"	Ocuituco	6	11	7	T	50
50						Rama con corteza	150
51						Rama sin corteza	150
52	"	Tetela	7	12	4	T	100

FASE DE LABORATORIO

El estudio se realizó en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en el laboratorio 128 de Fitopatología del Instituto de Fitosanidad.

2.2.7 Preparación del material vegetal

Las muestras se mantuvieron en un cuarto frío a 5° C mientras no se procesaban. De cada muestra se seleccionaron submuestras del material vegetal con daños visibles de necrosamiento en raíz, corona y tallo (Figura 2.4) y se prepararon por separado como sigue:



Figura 2.4. Muestras de: a) Raíz secundaria, b) corona, c) tallo

- a) Primero se lavó la submuestra seleccionada con agua corriente del grifo para eliminar la tierra adherida a raíces leñosas.
- b) Se cortaron en rodajas de 1 cm.
- c) Se hicieron trozos de 0.5 x 0.3 cm.
- d) Estos se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % (Anexo 2.2).
- e) Se utilizó tres tiempos de desinfestación: 1.5, 3, y 5 minutos.
- f) Se realizó un triple enjuague en agua destilada esterilizada
- g) Se colocaron los trozos en toallas absorbentes esterilizadas para secarlos (Figura 2.5).

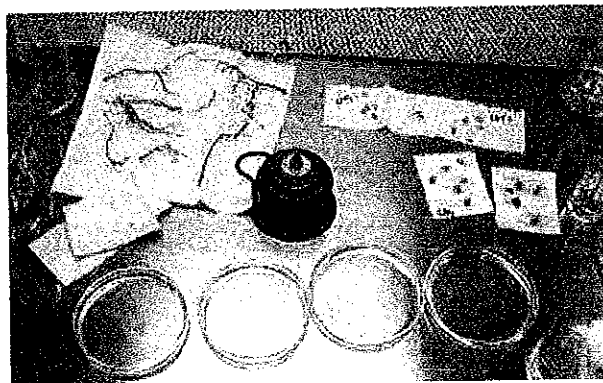


Figura 2.5. Desinfestación y secado de cortes de raíz para aislamiento de hongos.

2.2.8. Aislamiento de hongos

1. Se utilizaron cuatro medios de cultivo: Papa-dextrosa-agar (PDA), Papa-zanahoria-agar (PCA), Jugo V8, y Extracto de Malta-Agar (EMA) (Difco®) (Anexo 2.3-2.6).
2. Se sembraron cuatro trozos de material vegetal por cada caja Petri con medio de cultivo (Figura 2.6).

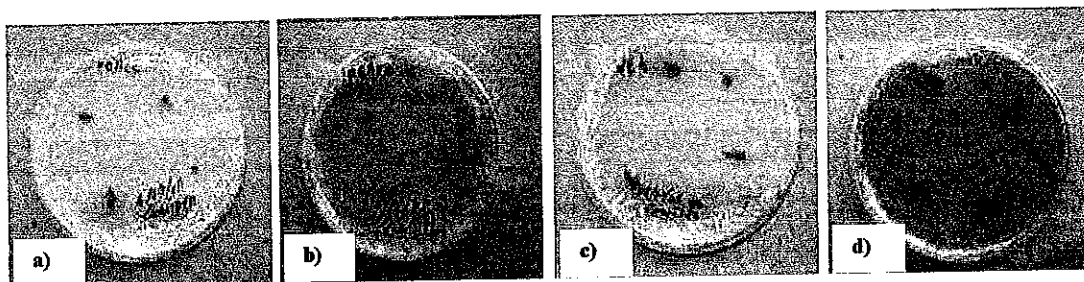


Figura 2.6. Siembra en cuatro diferentes medios de cultivo: a) PDA, b) PCA, c) V8 y d) EMA.

3. Se incubaron las cajas en cuatro condiciones de incubación (iluminación): 1) luz blanca a 40 watts (Osraw®), 2) luz negra a 40 watts (General Electric®), 3) alternancia de luz (12 h) – oscuridad (12 h), y 4) oscuridad constante. Todo a temperatura de laboratorio (22 ± 3 °C).

4. Las colonias fungosas que no produjeron estructuras en las condiciones mencionadas se transfirieron a medio de cultivo PCA y se incubaron en luz germicida (Tecnolite®) de 40 watts para inducir la formación de estructuras reproductivas.
5. Las colonias resultantes se separaron en grupos de acuerdo al color, y forma de crecimiento.

2.2.9. Purificación de hongos aislados

Las colonias que produjeron conidios se purificaron por la técnica de cultivos monospóricos, y las que no produjeron estructuras reproductivas con la técnica de punta de hifa.

Cultivos monospóricos. Se tomó una pequeña porción de la colonia con conidios con una aguja de disección y se diluyó en tubos con 10 mL de agua destilada esterilizada, se agitó en un vortex (VWR®) durante cinco segundos (tres veces para cada tubo), y se vació en cajas Petri con medio Agua-Agar (A-A) (Anexo 2.7); se esperó 0.5 minutos para sedimentar los conidios y desechar el líquido, y se secó el borde en toallas absorbentes esterilizadas. A las 24 h se tomó un conidio germinado con ayuda de un microscopio estereoscópico (American Optical®) y una aguja de punta fina (jeringa hipodérmica de insulina), se transfirió a medio MEA, y se incubó en condiciones naturales de laboratorio.

Punta de hifa. Se sembró una alícuota de la colonia en medio A-A y a las 24 h se observó al microscopio estereoscópico y con ayuda de una aguja de punta fina se tomó la punta de una hifa en crecimiento y se colocó en alguno de los medios según el hongo purificado.

2.2.10. Conservación de colonias

Los conidios de cultivos monospóricos se almacenaron en un ultracongelador (Revco®) a -85°C . Con ayuda de pipetas Pasteur esterilizadas se depositó sobre la colonia en caja Petri 1 mL de glicerol (Reasol®) al 25% (Anexo 2.4), se suspendieron los conidios con ayuda de una aguja de disección y se pasaron a tubos criogénicos (Cryovia®) esterilizados, se etiquetaron y se colocaron en el ultra congelador (Figura 2.7).

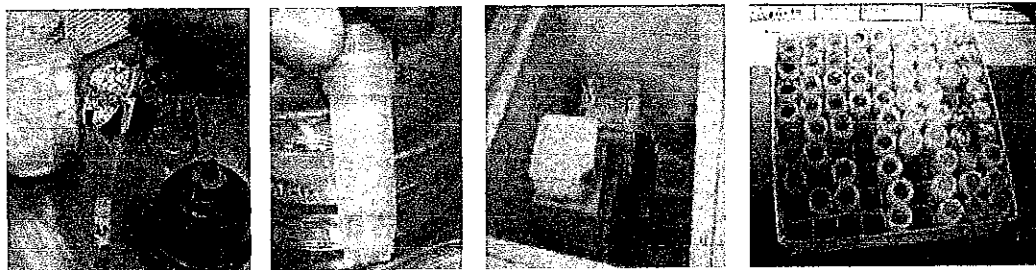


Figura 2.7. Conservación de cultivos monospóricos en ultra congelación.

Para el caso de las colonias que no produjeron conidios los cultivos se conservaron en tubos de ensaye inclinados con medio PDA y aceite mineral esterilizado (Reasol ®).

2.2.11. Identificación morfológica

1. Se prepararon montajes para su observación en microscopio compuesto (American Optical®). Se colocó una gota de glicerol al 50 % (Anexo 2.8) en un portaobjetos y se colocó una pequeña porción de micelio con una aguja de disección, posteriormente se depositó el cubreobjetos para su observación al microscopio. Se flameó la preparación que así lo requería.
2. Para la identificación a nivel de género se tomó en cuenta el color, forma de la colonia, formas y color de estructuras morfológicas, según las claves y descripciones de Barnett y Hunter (1998).

3. Se realizaron 25 mediciones de cada estructura por aislamiento: conidios y fialides. Para la identificación a nivel de especie se consideraron las descripciones de Booth (1971) y Domsch y Gams (1980).

2.2.12. Caracterización molecular

Extracción de ADN

Se realizó en el laboratorio de biotecnología No. 209 de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, y con la colaboración de la laboratorista molecular Ing. Iobana Alanís Martínez.

Se utilizó el método de Ahrens y Seemuler, 1992, y Lee *et al*, 1993:

1. Macerado de la muestra. Con ayuda de una espátula se raspó una pequeña porción de la colonia con 8 días de crecimiento y se maceró en un mortero adicionando 700 µl de MLO (Anexo 2.9).
2. Se adicionó 700 µl de MLO más y se mezcló por inversión.
3. Centrifugado a 14 mil revoluciones por minuto, durante 10 minutos a 4 °C.
4. Se decantó el sobrenadante, manteniendo la pastilla.
5. Se adicionó 500 µl de buffer de extracción CTAB (Anexo 2.10) y se resuspendió la pastilla con ayuda de un vortex.
6. Se incubó a 60° C durante 45 minutos.
7. Se adicionó 700 µl de cloroformo alcohol isoamílico.
8. Se mezcló por inversión muy bien y se centrifugó a 10 mil rpm durante 10 minutos.
9. Recuperado de la fase acuosa y se colocó en tubo Eppendorf nuevo
10. Se adicionó 500 µl de isopropanol y se mezcló por inversión.
11. Se incubó a -20° C durante 1 h.

12. Centrifugado a 14 mil rpm durante 10 minutos. Decantándose el sobrenadante.
13. Se secó la pastilla a temperatura ambiente y se disolvió en 50 µl de agua grado PCR.
14. La calidad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1% por electroforesis y se visualizó en un transiluminador Bio Rad®.

Amplificación por PCR

Por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se amplificó la región interna ITS (*Internal Transcribed Spacer*), ITS1 e ITS2, de los genes ribosomales RNA 18S-5.8S-28S. Se utilizó un juego de iniciadores ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAACTCGTAACAAGG) (White *et al.*, 1990).

La reacción de PCR, para un volumen final de 50 µl fue: agua desionizada estéril 30.1 µL; Buffer concentración 1X, 5 µL; MgCl₂ a 2.5 mM, 2.5 µL; dNTP'S a 200 mM, 1 µL; iniciadores a 20 pmol, ITS4 4µL, ITS5 4µL; Taq DNA polimerasa 1U, 0.4 µL y 3.0 µL de muestra de DNA.

Se utilizó un termociclador Bio Rad con el siguiente programa de amplificación: 95° C por 2 minutos de desnaturalización inicial, 30 ciclos de desnaturalización, alineación y extensión de 95° C por 1 minuto; 50° C por 30 segundos y 72° C por 2 minutos, y una extensión final a 72° C durante 10 minutos (White *et al.*, 1990).

La calidad de la amplificación se visualizó por electroforesis con gel de agarosa al 1 % en un transiluminador Bio Rad®.

Purificación

La purificación de la amplificación se realizó con el kit comercial de QIAGEN, protocolo y reactivos para purificación de PCR de QIAquick®.

Secuenciación

Se secuenció en dos direcciones: 5' → 3' y 3' → 5' con los mismos iniciadores ITS mencionados en 3.11.6.2. El secuenciador utilizado fue un ABI PRISM 3700 de la Cía. Macrogen en Korea del Sur.

Alineación de las secuencias

Las secuencias se analizaron en el programa Lasergene 2001, versión 5 de DNASTAR Inc. La alineación se realizó en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (www.nlm.nih.gov).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

FASE DE CAMPO

2.3.1. Características de los huertos seleccionados

La siguiente información se obtuvo directamente de los propietarios de los 13 huertos muestreados y por directivos de la Sociedad Cooperativa Frutas Finas de Morelos (FRUFIMOR) a través de encuestas personales.

Variedades

Los huertos están plantados sobre un patrón criollo y dos variedades, Amapre y Diamante Especial, y en mayor porcentaje con esta última. Estas variedades fueron introducidas del estado de Puebla. Para establecer los huertos se derribó

el bosque de encino-pino (vegetación natural del lugar). Estas variedades según Rodríguez y Sherman (1995), Pérez (1995) y Díaz y Martínez (1988) fueron unas de las introducidas recientemente en el proceso de mejoramiento genético en México, tomando como criterios sus requerimientos de frío, épocas de floración y cosecha, firmeza del fruto y resistencia a la cenicilla. En este aspecto, las variedades utilizadas en la región de estudio tienen la ventaja sobre los materiales criollos principalmente en la resistencia a esta enfermedad foliar, de ahí la aceptación por parte de los productores.

Arreglo topológico

En su mayoría los huertos son de pequeña extensión, menos de una hectárea y mayores de siete años en promedio. Están sembrados en marco real, de cuatro metros la distancia entre árboles y cuatro entre hileras, con lo que se obtiene una densidad de siembra adecuada ($625 \text{ árboles/ha}^{-1}$) (Pérez, 1990; CESAVER, 2008)

Etapas fenológicas

La mayoría de los huertos estaban en producción. Los más jóvenes ya tenían más de cuatro años de sembrados. Se obtiene dos cosechas al año mediante la técnica de producción forzada. El rendimiento promedio es de 5 t/ha^{-1} . Tomando en cuenta los reportes de rendimiento del promedio nacional de 8.1 t/ha^{-1} en condiciones de temporal, está por debajo la media en la región de estudio (SIACON, 2004).

Riego

El suministro de agua principalmente es de temporal y se dan riegos de auxilio con un sistema de mangueras y por acción de la fuerza de gravedad se hace llegar el agua hasta los huertos, la cual es traída de la parte montañosa, y en

algunos casos es almacenada en estanques dentro del mismo huerto y de ahí distribuida a los árboles cada semana durante cinco meses (enero a mayo). Mediante este sistema no suministra el agua de acuerdo a los requerimientos hídricos de los árboles, sino basado en un calendario acordado por turnos entre los productores, por lo que en algunos huertos no se cumplen las necesidades, pero en otros se inunda el área de goteo de los árboles, rebasando los volúmenes recomendado (Pérez, 1990 y 1995; Zegbe *et al.*, 2005).

Uso de agroquímicos

Fertilización. Los productores la realizan dos veces al año, 0.5 kg por árbol cada vez, y se utiliza el fertilizante superfosfato de calcio triple. Con estas cantidades se rebasa la dosis recomendada de 65 kg de nitrógeno, fósforo y potasio para árboles en producción (Pérez, 1990), además no se consideran microelementos en los programas de fertilización. Aunque se requieran en menores cantidades son necesarios para mantener el equilibrio nutrimental, pues si se corrigen las deficiencias de un solo elemento se pueden modificar la disponibilidad y la demanda de otros.

De acuerdo a los resultados del análisis de suelo realizado en UACH para los huertos en estudio, se obtuvo lo siguiente: el pH, materia orgánica, y textura son los adecuados para el cultivo (Cuadro.2.2). La fertilidad, de acuerdo a la cantidad del elemento disponible está dentro de los rangos de medio para nitrógeno, muy alto en potasio, y alto en manganeso y boro (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.2. Condiciones de pH, materia orgánica y textura del suelo en huertos de Tetela del Volcán y Ocuituco, Morelos.

Propiedad	Resultado	Optimas*
pH	5.37	5.2-6.7
Mo	2.55	1.0-1.9 (Bajo) 2.0-2.5 (Normal) 2.6-3.5 (Alto) > 3.6 (Muy alto)
Textura	Franco arcillo-arenoso	Franco
Arena	51.32	
Limo	27.28	
Arcilla	21.40	

*JE, 1992; Casas y Casas, 1999

Cuadro 2.3. Fertilidad del suelo en huertos de Tetela del Volcán y Ocuituco, Morelos.

Elemento	Resultado (mgKg ¹)	Rango (mgKg ¹)	Categoría*
Nitrógeno	21.5	0-10 11-20 21-35 36-80 Mas de 81	Muy bajo Bajo Medio Alto Muy alto
Fósforo	200.12	-	-
Potasio	436	Menor o igual 50 50.1-100 100.1-180 180.1-250 Igual o mayor 250	Muy bajo Bajo Medio Alto Muy alto
Calcio	1304	-	-
Magnesio	675	-	-
Zinc	0.75	-	-
Manganeso	9.64	Menor a 0.2 0.2-0.5 0.6-1 Mayor a 1	Muy bajo Bajo Medio Alto
Boro	1.95	Menor a 0.2 0.2-0.5 0.5-1.0 Mayor a 1	Muy bajo Bajo Medio Alto

*JE, 1992; Casas y Casas, 1999

Control de plagas. Se lleva a cabo a través de la campaña Mosca de la Fruta, que es el principal problema y al cual se le da importancia. Se realizan trampeos de adultos de moscas con trampas tipo Mac Phail y aplicaciones

dirigidas de Malathion® 1000 E (malation), único producto autorizado en la campaña. El programa de control es supervisado por personal del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos. Para evaluar el avance en el control de esta plaga se considera el índice de Moscas por Trampa por Día (MTD). Se establecen los rangos según la normativa NOM-FITO-023-1995, Campaña Nacional Contra Moscas de la Fruta: zona bajo control fitosanitario, mayor de 0.0100; de baja prevalencia, menor o igual a 0.0100; y zona libre 0.0000. De acuerdo a estas categorías, todos los municipios del estado de Morelos están bajo control fitosanitario (SENASICA, 2008).

Control de enfermedades. Según la información obtenida en campo, y de acuerdo a DEA (2006) y CESAVER (2008), los productos usados por los productores sólo tienen efecto en el control de la pudrición café del fruto (*Monilinia fruticola*) y cenicilla (*Sphaerotheca pannosa*), es decir enfermedades de la parte aérea del árbol con: Promyl® (Benomilo), Rally® (Myclobutanil) y Tilt® (propiconazol); por lo tanto no se aplican agroquímicos para el control de enfermedades de la raíz.

2.3.2. Fechas de muestreo

Los síntomas que se describirán en el apartado 2.3.3.2 se observaron en las cuatro fechas de muestreo, y en todos los 13 huertos seleccionados y 13 árboles muestreados (uno por huerto).

2.3.3. Evaluación de la incidencia

2.3.3.1. Incidencia

El tamaño de muestra para calcular el porcentaje de incidencia no fue fijo para cada uno de los huertos, es decir se consideró el número total de árboles y el número de árboles enfermos en cada huerto, no por superficie. De esta manera se obtuvieron tres categorías (Cuadro 2.4):

Inicial. En los huertos con daños iniciales se tuvo una incidencia que fluctuó entre el 5 y 8 %.

a) Intermedia. En los huertos clasificados en esta categoría, de acuerdo al número de árboles enfermos, la incidencia fue de 40-50 %, pero individualmente fueron síntomas de amarillamiento, con ramas muertas, y completamente muertos.

b) Avanzada. Se clasificó a los huertos ya incluso abandonados o con cambio de especie frutal cultivada (aguacate y chirimoya) en proceso (Cuadro 2.4).

Según reportado en los estudios de *Fusarium* spp. atacando duraznero en países como: Brasil (Corazza y Chilosi, 1986), China (Wu *et al.*, 1982), Estados Unidos (Hine, 1961), Francia (Jailloux y Froidefond, 1979), Nueva Zelanda (Hartill y Broadhurst, 1989), Puerto Rico (Rodríguez y Hernández, 2004), Rusia (Namoradze, 1973, 1975), y Hungría (Rozsnyay *et al.*, 1992), no especifican datos de incidencia, sólo se identificaron los patógenos asociados y se mencionaron los daños ocasionados al cultivo.

En Turquía (Sipahioglu *et al.*, 2006), y Venezuela (Rondón, 1990) reportan daños como: secazón, afectando el crecimiento; pudrición de raíz, canchales en tallo, muerte regresiva de ramas, y gomosis, pero no evaluaron la incidencia de estas enfermedades. En Egipto se identificó a *Fusarium solani*, asociado con *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* causando decline de plántulas pero sólo se reportó como una incidencia alta favorecida por la humedad del suelo y baja temperatura en el mes de noviembre (Abdou *et al.*, 1982).

Para *Verticillium* sp. y *Rosellinia necatrix*, se reportaron éstos asociados a duraznero en el estado de México por Elías *et al.* (2007) y evaluaron el porcentaje de aislamiento para cada especie, pero no la incidencia de la enfermedad.

De la misma manera *Gliocladium* se asocia con la muerte regresiva, como una de las especies más dañinas en la República de Georgia (Kanchaveli, 1997); y además, causando daños en frutos en postcosecha en Rusia (Sumbali y Mehrotra, 1981) pero sin citar datos de incidencia.

Cuadro 2. 4. Incidencia de árboles enfermos en huertos de Ocuituco y Tetela del Volcán.

Huerto	No.	Clasificación	Total árboles	Árboles enfermos	Incidencia (%)
Ocuituco	1	Intermedio	150	75	50
Ocuituco	2	Inicial	500	30	6
Ocuituco	3	Intermedio	320	128	40
Ocuituco	4	Inicial	300	18	6
Ocuituco	5	Avanzado	150	150	100
Ocuituco	6	Inicial	250	15	6
Tetela del Volcán	1	Inicial	300	21	7
Tetela del Volcán	2	Inicial	300	15	5
Tetela del Volcán	3	Inicial	200	10	5
Tetela del Volcán	4	Inicial	350	22	6
Tetela del Volcán	5	Inicial	660	50	7.5
Tetela del Volcán	6	Inicial	500	25	5
Tetela del Volcán	7	Inicial	500	40	8

2.3.3.2. Síntomas de la enfermedad

En follaje:

- a) **Iniciales.** Aparecen como amarillamiento, apariencia de decaimiento (leve pérdida de vigor) generalizada del árbol y deficiencia nutrimental, el color verde de las nervaduras resalta del resto del foliolo, y muerte de la parte apical de las ramas (muerte descendente) (Figura 2.8 y 2.9). Estos síntomas, principalmente el amarillamiento y la muerte de ramitas, son similares a los reportados por

Sztejnberg y Madar (1980), Sinclair et al. (1987) y Sztejnberg (1990) ocasionados por *Rosellinia necatrix*.

- b) **Intermedios.** Se presentó la marchitez y se secaron todas las hojas de la rama, iniciando con las partes apicales hacia abajo. Se observó ramas muertas y aparentemente sanas en el mismo árbol (Figuras 2.10 y 2.11). Esta característica fue descrita por Pérez (1990) y Sotomayor (1997) causada por *Verticillium* sp.
- c) **Avanzados.** Cuando la muerte fue gradual se defolió el árbol; y quedaron adheridas al colapsarse (Figura 2.12).

Al parecer no hay un patrón de comportamiento del árbol como respuesta al ataque de ciertos hongos, porque depende de varios factores, sin embargo Smith et al. (1992) señaló que si el follaje permanece verde hasta mediados de verano, y después de esto se da el colapso en vez de ser gradual el amarillamiento de las hojas, son síntomas indicativos de la podrición de la raíz por *Armillaria*, lo que no corresponde a lo observado en campo porque se da precisamente gradualmente, por lo tanto se descarta a este hongo como responsable de la marchitez.



Figura 2.8. Inicial: a) Amarillamiento del follaje, b) apariencia de deficiencia nutricional.

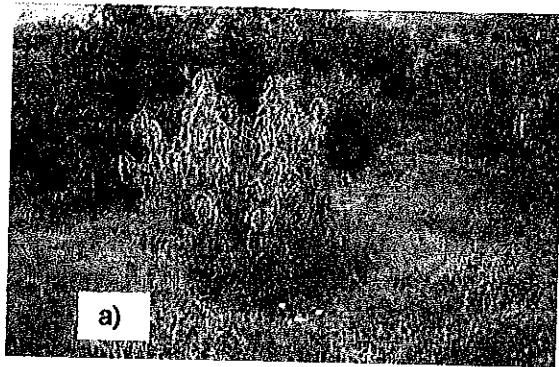


Figura 2.9. Inicial: a) Árbol joven (4 años) con síntomas de decaimiento. b) Árbol en edad productiva con los mismos síntomas. Se observa el contraste con los sanos al fondo y la existencia de ramas aparentemente sanas.

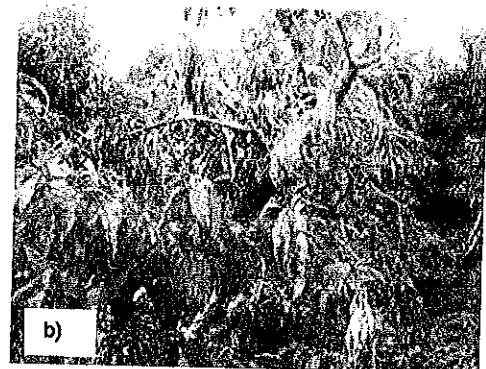
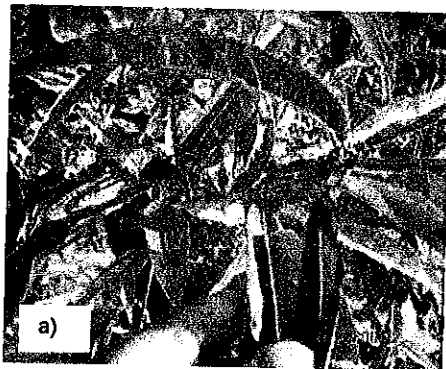


Figura 2.10. Intermedio: Muerte apical, inicia con la marchites de las hojas más recientes (a), y posteriormente se seca toda la ramita (b).



Figura 2.11. Intermedio: Es común observar ramas muertas y aparentemente sanas en el mismo árbol, ya sea en: a) árboles jóvenes menores de 4 años, b) en plena producción (7años) y c), d) 10 años.

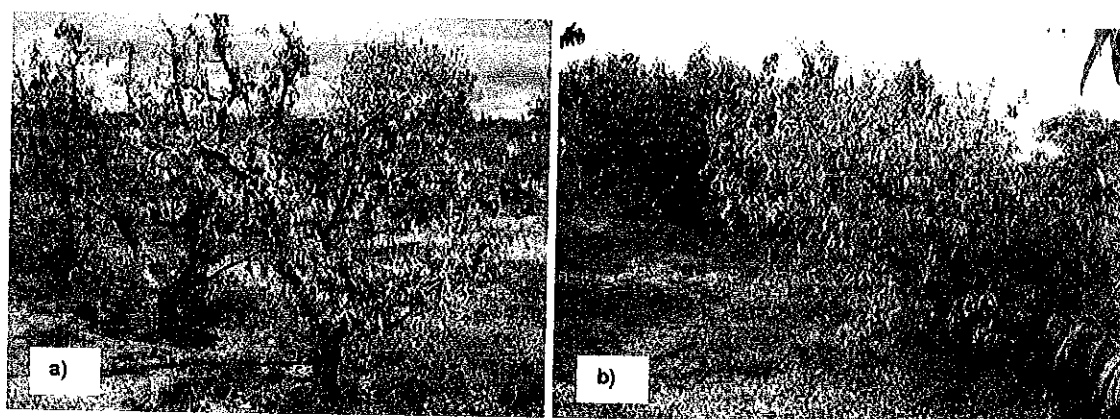


Figura 2.12. Avanzado: a) Follaje totalmente seco pero adherido al árbol.
b) Enfermo en contraste con árboles sanos.

En frutos:

- a) **Iniciales.** En etapas tempranas de la enfermedad no se diferenció entre los frutos de los árboles enfermos con los sanos.
- b) **Intermedios.** Fueron producidos en cantidad aparentemente mayor que en los árboles sanos pero al parecer no se desarrollaron completamente y se observó la mayoría caídos alrededor del árbol.
- c) **Avanzados.** Fueron pequeños, secos, y quedaron adheridos al colapsarse el árbol, igual que el follaje. Estos frutos no tienen valor comercial (Figura 2.13).

La característica de frutos pequeños concuerda con lo descrito por Haygood *et al.* (1986), Wilcox y Ellis (1989), ocasionado por *Phytophthora* spp. Asimismo Sztejnberg y Madar (1980), Sinclair *et al* (1987), Sztejnberg (1990) señalaron que dejan de crecer, se marchitan y caen al suelo, refiriéndose a síntomas inducidos por *Rosellinia necatrix*. Pero la particularidad de quedarse adheridos al colapsarse el árbol es similar a lo señalado por Suárez *et al.* (1999), Aponte *et al.* (2001) y lo asociaron al complejo de hongos *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* sp. y *Fusarium* spp., los cuales causan la enfermedad conocida localmente en Venezuela como secazón o muerte repentina.

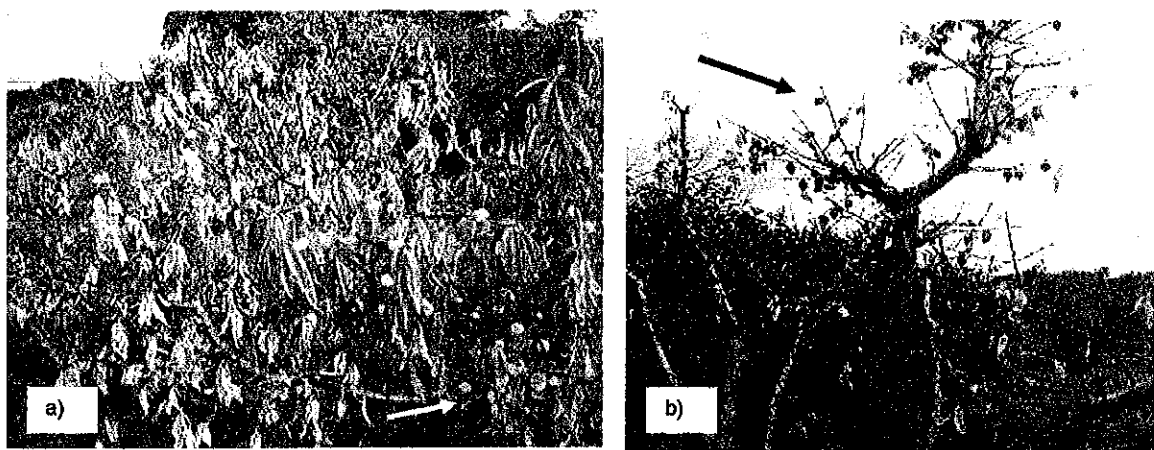


Figura 2.13. Daño avanzado: a) Frutos producidos en gran cantidad pero sin valor comercial. b) Frutos y follaje secos adheridos al árbol

- a) **Iniciales.** En el tallo se observó oscurecimiento de los vasos conductores de color café claro a oscuro (Figura 2.14).
- b) **Intermedios.** Necrosamiento en el centro del tallo en forma de manchas irregulares desde el nivel del suelo (base del tallo) hasta las ramas en árboles mayores de 7 años (Figura 2.15), y en los menores de esta edad sólo se encontró el necrosamiento hasta antes de iniciar las primeras ramas. En cortes longitudinales las manchas se observan en forma de vetas en todo el centro del tallo y ramas (Figura 2.16).
- c) **Avanzados.** Tronco y ramas totalmente secos. (2.17).

Estas características son señaladas como afectaciones vasculares, debido a que los hongos que las causan, se ubican en los vasos del xilema, penetrando por las raíces más tiernas de las plantas, y obstaculiza el paso ascendente del agua y sales. Además de que la infección puede ocurrir en algunos sectores del sistema vascular, por lo que los síntomas se pueden presentar inicialmente sólo en una rama o en un lado del árbol. Estos daños se observaron al cortar dichas ramas en los haces vasculares como un círculo interno de color café, y según Pérez (1990) y Sotomayor (1997) son característicos de *Verticillium*. En las muestras de campo procesadas, las lesiones fueron de diferentes medida, variando desde 0.5 hasta 3.0 cm de diámetro (Cuadro 2.5).

Otro síntoma fue la presencia de gomosis en troncos y ramas y que fue indiferente de acuerdo a la edad de los árboles, ya que se observó desde 4 años en adelante (Figura 2.18). Al respecto, según Rodríguez y Hernández (2004) en Puerto Rico se aisló e identificó a *Fusarium solani* y *F. oxysporum* ocasionando síntomas de gomosis además de pudrición de raíz, canchales en el tallo y muerte regresiva de ramas. En China también se reportó presencia de gomosis en tronco y ramas, asociada a *Fusarium* sp. además de *Macrophoma* y *Alternaria* en durazneros (Wu et al., 1982).

Cuadro 2.5. Tamaño de lesiones necróticas en tallos.

Municipio	No. huerto	No. Árbol	Edad	Muestra	Diámetro muestra	(cm) necrosis	% dañado
Ocuituco	1	1	7	Tallo	3.5	0.5	14.3
Ocuituco	2	2	7	Tallo	5.0	0.9	18
Ocuituco	3	3	10	Rama	3.8	1.8	47.4
Ocuituco	4	4	3	Tallo	3.5	0.6	17.1
Ocuituco	5	5	10	Tallo	5.0	3	60
Ocuituco	6	6	7	Tallo	5.0	0.3	6
Tetela del Volcán	1	7	7	Tallo	5.5	3	54.5
Tetela del Volcán	2	8	10	-	-	-	-
Tetela del Volcán	3	9	10	Tallo	4.5	0.6	13.3
Tetela del Volcán	4	10	15	Rama	3.0	0.5	16.7
Tetela del Volcán	5	11	4	Tallo	9.0	3.0	33.3
Tetela del Volcán	6	12	6	-	-	-	-
Tetela del Volcán	7	13	4	Tallo	2.5	-	0

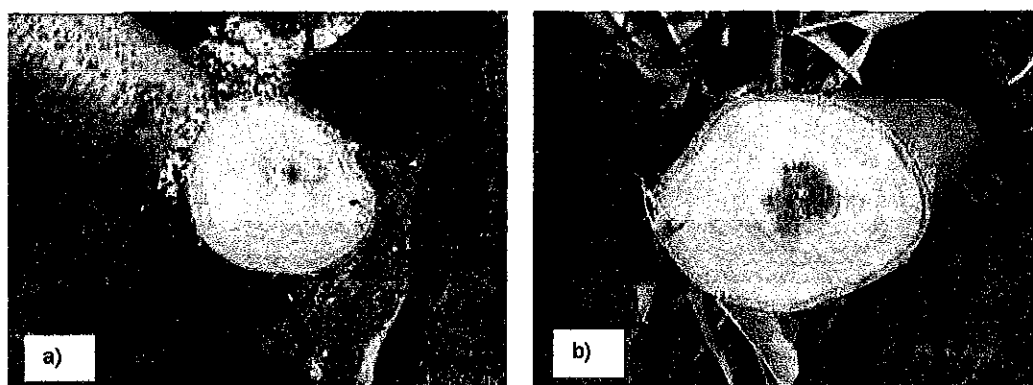


Figura 2.14. Iniciales: a) Necrosamiento inicial en el centro de una rama. b) Daño color café claro a oscuro conforme avanza el necrosamiento en el tallo.

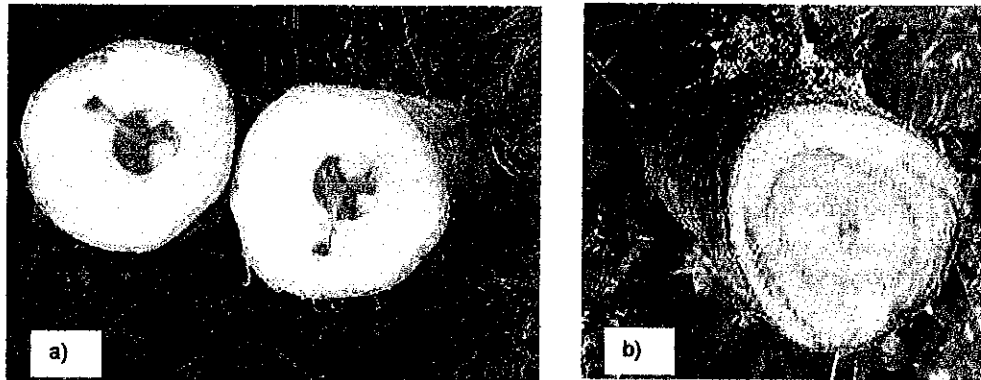


Figura 2.15. Intermedio: a) Necrosamiento en el centro de las ramas, circulares, y de forma irregular en cortes transversales, b) La rama puede estar aún sin secarse y con follaje pero ya con síntomas al realizar un corte.

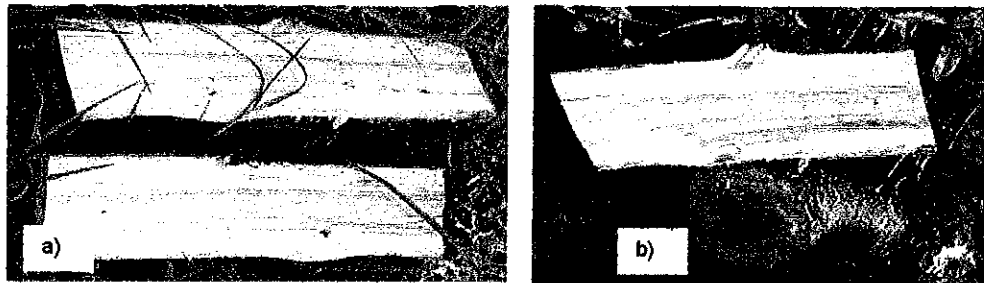


Figura 2.16. Intermedio: a) En cortes longitudinales se aprecia coloración café, b) café-rojizo en haces vasculares.

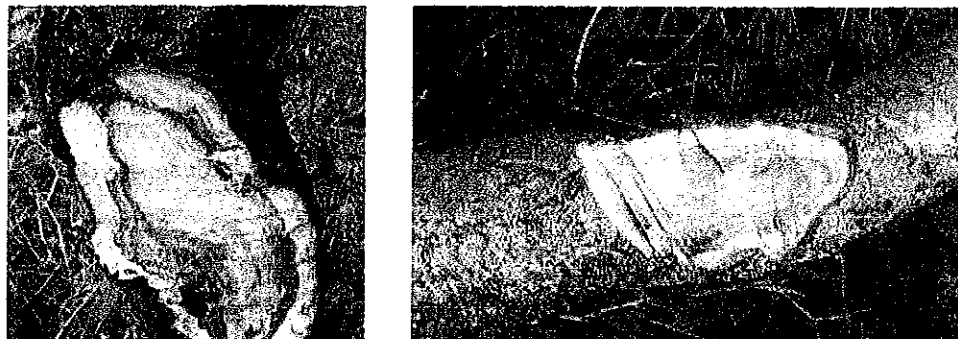


Figura 2.17. Avanzado: a) Necrosamiento generalizado, no solo en el centro sino en la mayor parte del tejido interno, b) el tallo completamente seco y con necrosis interna.

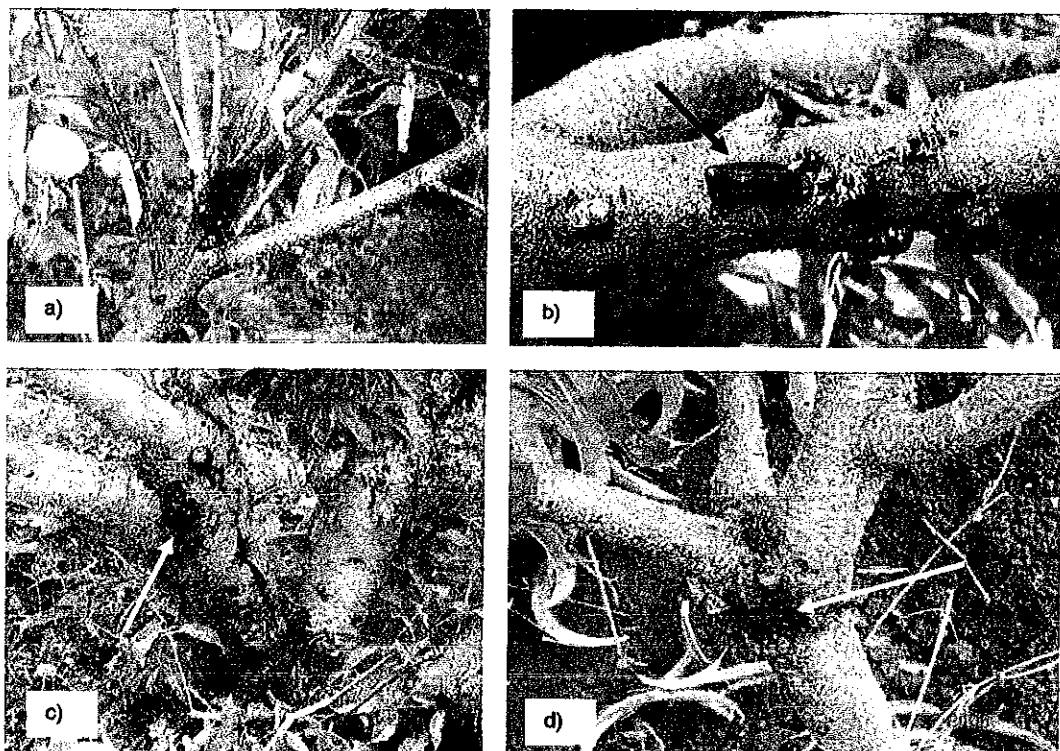


Figura 2.18. Presencia de gomosis de color ámbar a oscuro en ramas y troncos. a) En ramas de árboles con 7 años de edad; b) ramas de 10 años, c) canchros en tronco, de 15 años; d) tronco de 4 años.

En raíz

- a) Iniciales.** En raíces primarias y secundarias se observó micelio blanquecino sobre la corteza en las muestras (Figura 2.19) colectadas en el mes de junio, que corresponden a la temporada de mayor humedad en el suelo debido a la época de precipitación pluvial del año. Al realizar preparaciones con la técnica de cinta adhesiva se observaron conidios al microscopio.
- b) Intermedios.** Al realizar cortes transversales en raíces secundarias y terciarias, se observó necrosis en forma de manchas circulares e irregulares de color oscuro en el centro (médula), y además anillos (pericentro) encerrando estas manchas. En cortes longitudinales se

observaron estas manchas en forma de vetas en el centro, lo que corresponde al xilema primario y secundario de la raíz, según Coletto (1995) (Figura 2.20 y 2.21).

- c) **Avanzados.** Estas lesiones fueron mayores en raíces de menor diámetro, así en las de 4 cm se presentó una lesión necrótica no mayor a 0.5 cm, y en las de 2 cm. de diámetro las lesiones variaron de 1.0 a 1.8 cm (cuadro 2.6).

La presencia de micelio en raíces se reportó para *Rosellinia necatrix* (Sinclair *et al.*, 1987; Sztejnberg, 1990), pero no concuerda con lo observado en campo porque no es dentro de la corteza sino en la superficie, incluso se observó adherido al suelo (Figura 2.19), y tampoco es en forma de abanico según el mismo autor, sino algodonoso.



Figura 2.19. Iniciales. Presencia de micelio blanquecino sobre la corteza de raíces

Si hay similitud en la descripción de pudrición seca y muerte de raíces (Suárez *et al.*, 1999; Aponte *et al.*, 2001) causado por el complejo de los hongos *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* sp. y *Fusarium* spp. en Venezuela; así como en huertos comerciales de Estados Unidos con historial de vida corta del duraznero se reportó como ordinaria la presencia de *Pythium* y *Fusarium* en necrosis de raíces secundarias (Nyczepir y Lewis, 1984).

Como se observa en el cuadro 2.6, no se analizaron todas las raíces del árbol debido a que al tomar las muestras sólo se colectó las que mostraron daños notorios, esto por el tamaño de los árboles y la dificultad de mover físicamente mayor cantidad de tejido.

Cuadro 2.6. Lesiones necróticas en raíz con síntoma avanzado.

Municipio	Huerto	No. Árbol	Edad	Muestra de raíz	Diámetro de raíz (cm)	Diámetro de necrosis (cm)	% dañado
Ocuituco	1	1	7	Terciaria	1.0	0.2	20
Ocuituco	2	2	7	Secundaria	2.5	1.5	60
Ocuituco	3	3	10	Secundaria	2.8	0.2	7.1
Ocuituco	4	4	3	Secundaria	1.2	0.2	16.7
Ocuituco	5	5	10	Terciaria	2.7	0.5	18.5
Ocuituco	6	6	7	Primaria	2.5	1.0	40
Tetela del volcán	1	7	7	Secundaria	1.6	0.7	43.8
Tetela del Volcán	2	8	10	Secundaria	2.2	1.8	81.8
Tetela del Volcán	3	9	10	Secundaria	4.0	0.5	12.5
Tetela del Volcán	4	10	15	Secundaria	3.5	0.7	20
Tetela del Volcán	5	11	4	Raícula	0.2	No visible	-
Tetela del Volcán	6	12	6	Secundaria	1.2	0.3	25
Tetela del Volcán	7	13	4	Primaria	1.5	0.5	33.3

En corona

- a) **Iniciales.** En árboles jóvenes alrededor de 4 años la necrosis se observó en forma similar a la raíz: lesión en forma de pequeño círculo con coloración café, limitada al xilema primario (observado al realizar cortes transversales) (Figura 2.22).
- b) **Intermedios.** En árboles mayores de 10 años se encontró oscurecimiento de tejidos a nivel de la corteza y pudrición en la parte interna.
- c) **Avanzados.** En huertos con porciones de terreno con mayor concentración de humedad (partes bajas con respecto al resto del

terreno) se observó presencia de micelio blanquecino entre la corteza y la madera de la corona. Los montajes con cinta adhesiva no revelaron la presencia de conidios (Figura 2.23).

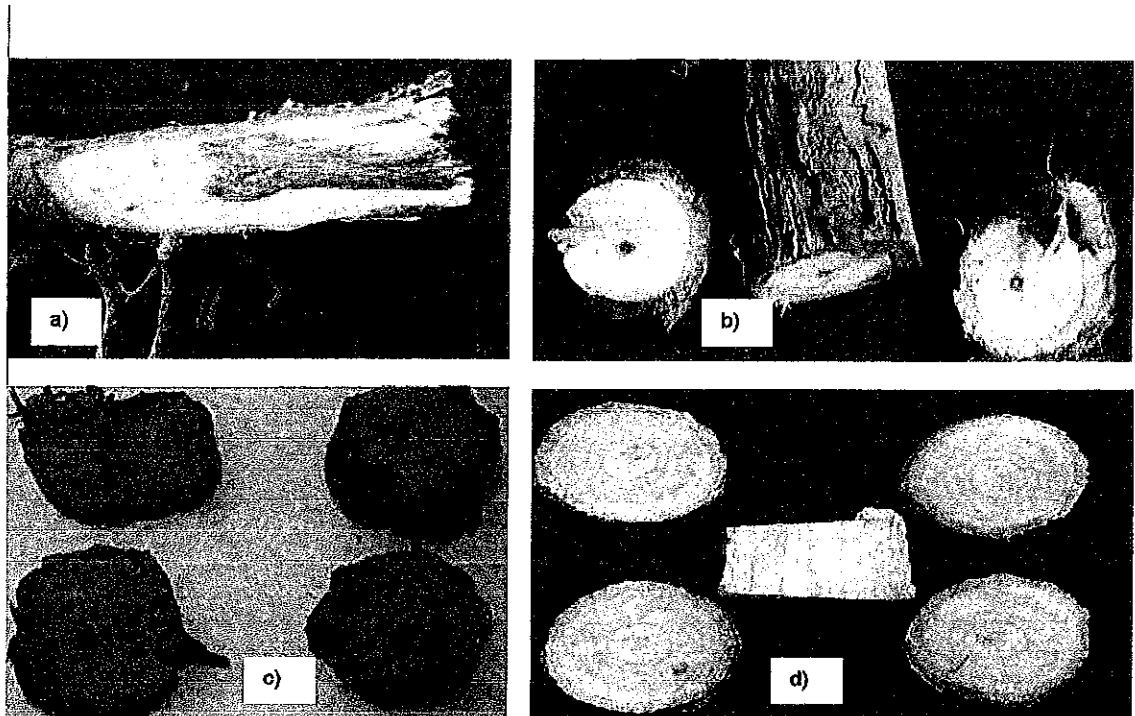


Figura 2.20. Intermedio. Necrosis en el centro de las raíces secundarias. a) En corte longitudinal. b) En forma de círculo. C) De forma irregular. d) Se observan también en forma de anillos (necrosis en el periciclo).

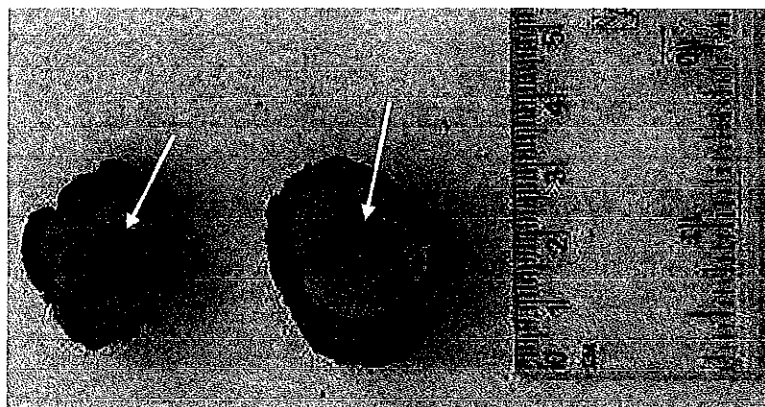


Figura 2.21. Intermedio. Detalle de la necrosis en forma de manchas irregulares en el centro (parénquima cortical) de las raíces.

Daños en corona

Aún cuando se reportó daños en la corona ocasionados por *Phytophthora* spp. por Wilcox y Ellis (1989) y Haygood *et al.* (1986), no fueron similares a los observados en campo, debido a que no hubo canchros, gomosis ni se circundó a nivel de la corona como se describió en estos estudios.

La capa blanquecina de micelio que se observó al levantar la corteza fue similar a lo descrito por Sinclair *et al.* (1987) y Szejnberg (1990), síntoma característico de la invasión del tejido por *Rosellinia necatrix*, pero también se asoció a la pudrición seca por *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium* sp. y *Fusarium* spp. en raíces (Suárez *et al.*, 1999; Aponte *et al.*, 2001).



Figura 2.22. Iniciales. Necrosis en corona de árbol de 4 años.

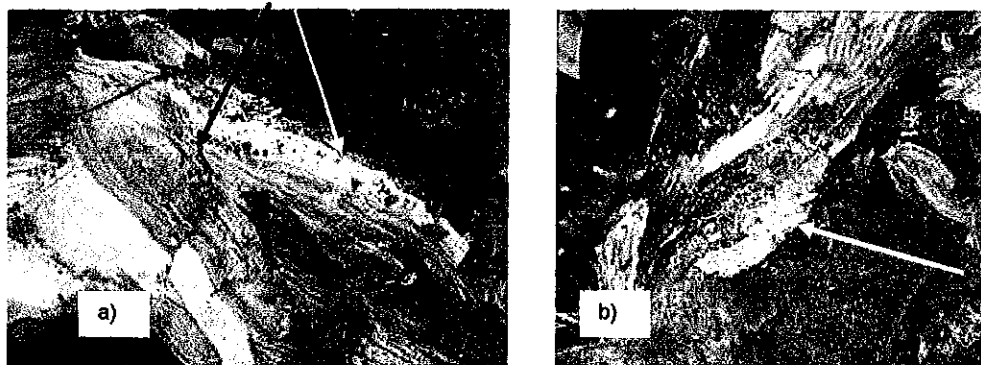


Figura 2.23. Avanzados. a) Oscurecimiento, pudrición, y presencia de micelio blanquecino, b) entre la corteza y la madera en la corona, en árboles de 10 -15 años de edad.

FASE DE LABORATORIO

2.3.4. Preparación del material vegetal

De los tres tiempos utilizados para la desinfestación de las muestras provenientes del campo el mas adecuado fue el de 3 minutos, ya que se tuvo menor cantidad de contaminantes que al proporcionar 1.5 minutos, y con 5 minutos en varias muestras no hubo crecimiento de colonias.

2.3.5. Aislamiento de patógenos

Las primeras colonias de hongos fueron visibles después de 72 horas y las últimas a las 120 horas, principalmente de los trozos sembrados que tuvieron un tratamiento de desinfestación de 5 minutos.

De los cuatro medios de cultivo utilizados dieron mejores resultados el EMA y el PCA, el primero estimula la pigmentación de las colonias y el segundo la producción de estructuras reproductivas.

De las cuatro condiciones de luminosidad utilizadas se observó que los aislamientos de *Fusarium* spp., *Verticillium* sp. y *Gliocladium* sp. se desarrollaron mejor en alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad; sólo un aislamiento correspondiente a *Dematophora* sp. se vio favorecido en la velocidad de crecimiento en condiciones de oscuridad total.

Agrupando los aislamientos por sus características de color, y forma de crecimiento se obtuvieron 20 grupos. Las colonias con estas características crecieron de todas las muestras de: raíz, corona y tallo (Cuadro 2.7, 2.8 y Figura 2.24):

Cuadro 2.7. Pigmentación de las colonias aisladas de raíz, tallo, corona y tallo.

No de grupo	Características del grupo
1	Blanco, algodonoso
2	Blanco algodonoso y violeta inmerso en el medio
3	Blanco algodonoso y blanco amarillento
4	Blanco, aterciopelado
5	Blanco-amarillento
6	Blanco amarillento con márgenes naranja
7	Blanco grisáceo
8	Blanco-crema algodonoso
9	Blanco y rosa algodonoso
10	Crema, inmerso en el medio
11	Crema a amarillo, aterciopelado
12	Rosa pálido, algodonoso
13	Rosa pálido y blanco algodonoso.
14	Rosa algodonoso y blanco amarillento.
15	Rosa púrpura
16	Púrpura, algodonoso
17	Púrpura algodonoso y crema-amarillento aterciopelado
18	Púrpura, inmerso en el medio
19	Violeta inmerso
20	Rojo ladrillo, inmerso en el medio.

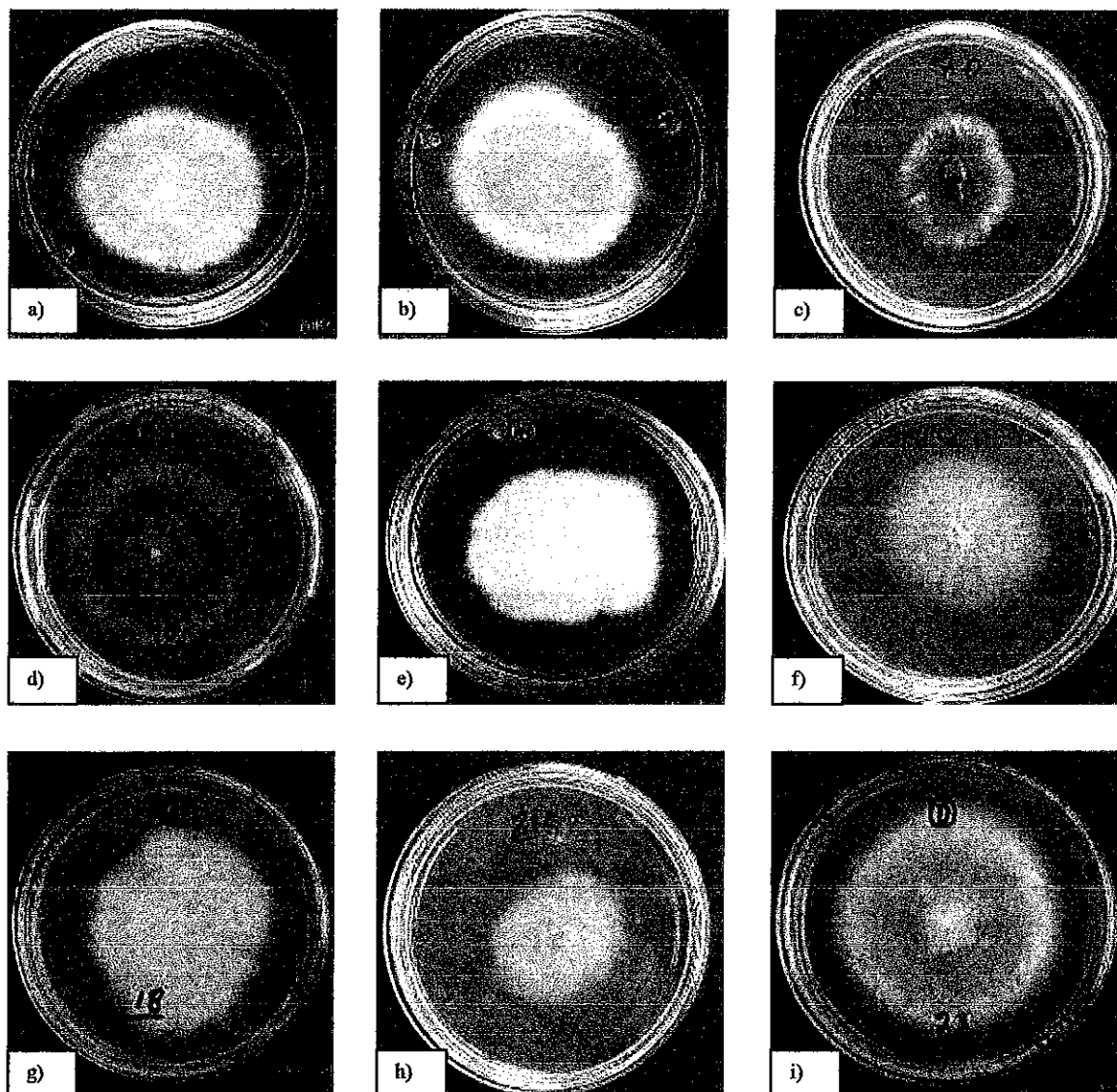


Figura 2.24. Diferentes grupos de colonias por pigmentación y forma de crecimiento de *F. oxysporum*. a) blanco algodónoso regular, b) rosa algodónoso, c) rojo ladrillo inmerso en el medio, d) violeta inmerso en el medio, e) rosa pálido algodónoso, f) blanco-crema inmerso, g) púrpura algodónoso, h) crema inmerso y i) blanco algodónoso abundante.

Cuadro 2.8. Por ciento de hongos aislados de muestras de árboles enfermos en huertos de dos municipios.

No. de árbol	Origen de la muestra	Edad del árbol (años)	Tejido muestreado	Profundidad/ altura (cm)	No. de grupo	Hongo aislado	%
1	Ocuituco 1	7	R* secundaria	0-15	17	<i>F. oxysporum</i> y <i>G. roseum</i>	80-100
			T**	100	16	<i>F. oxysporum</i>	80-100
2	Ocuituco 2	7	R secundaria	0-15	13	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			R terciaria	15-40	13	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			T	150	19	<i>F. oxysporum</i>	40-60
3	Ocuituco 3	10	R secundaria	0-15	13	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			R terciaria	15-40	6	<i>F. solani</i>	60-80
			T	200	16	<i>F. oxysporum</i>	80-100
4	Ocuituco 4	3	R absorbente	10	9	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			R primaria	35	3	<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	80-100
			R secundaria	15	9	<i>F. oxysporum</i>	60-100
			C***	5	6	<i>F. solani</i>	
			T	10	19	<i>F. oxysporum</i>	40-60
			T	30	19	<i>F. oxysporum</i>	40-60
5	Ocuituco 5	10	R absorbente	10 -20	9	<i>F. oxysporum</i>	
			R secundaria	15-40	9	<i>F. oxysporum</i>	60-80
			R terciaria	15-40	17	<i>F. oxysporum</i> y <i>G. roseum</i>	60-80
6	Ocuituco 6	7	R cuarta	15-40	1	<i>F. oxysporum</i>	40-60
			R absorbente	10-20	10	<i>F. oxysporum</i>	
			R secundaria con corteza	15 -40	16	<i>F. oxysporum</i>	60-80
			R primaria con corteza	15-40	1	<i>F. oxysporum</i>	60-80
			R primaria sin corteza	10	16	<i>F. oxysporum</i>	40-60
			C sin corteza	0 -10	20	<i>F. oxysporum</i>	60-80
			C con corteza	0-10	18	<i>F. oxysporum</i>	60-80
			T	50	12	<i>F. oxysporum</i>	60-80
7	Tetela 1	7	Raia con corteza	150	1	<i>F. oxysporum</i>	
			Raia sin corteza	150	12	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			R superficial	0-15	12	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			R secundaria	15-40	2	<i>F. oxysporum</i>	60-80
8	Tetela 1	7	C	0-15	16	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			T	150	16	<i>F. oxysporum</i>	60-80
8	Tetela 2	10	R superficial	0-15	3	<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	60-80
9	Tetela 3	10	R superficial	0-15	17	<i>F. oxysporum</i> y <i>G. roseum</i>	76-80
10	Tetela 4	15	R-corona	0-15	14	<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	60-80
			R secundaria	15-40	9	<i>F. oxysporum</i>	60-100
			C sólo corteza	0 -15	11	<i>G. roseum</i>	60-80
			T	150	3	<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	60-80

11	Tetela 5	4	R sólo corteza	0-10	3	<i>F. oxysporum</i> y <i>F. solani</i>	40-60
			R absorbente	15-30	1	<i>F. oxysporum</i>	60-80
			R secundaria sin corteza	20-40	1	<i>F. oxysporum</i>	60-80
			R terciaria con corteza	20-40	10	<i>F. oxysporum</i>	60-80
			R terciaria sin corteza	20-40	10	<i>F. oxysporum</i>	60-80
12	Tetela 6	6	R secundaria sin corteza	15-30	12	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			R secundaria con corteza	15-30	1	<i>F. oxysporum</i>	80-100
			R terciaria sin corteza	20-40	6	<i>F. solani</i>	60-80
13	Tetela 7	4	R secundaria solo corteza	15-30	8	<i>R. necatrix</i>	50
					7	<i>V. albo-atrum</i>	25
					15	<i>F. oxysporum</i>	50
			R secundaria sin corteza	15-30	8	<i>R. necatrix</i>	75
					15	<i>F. oxysporum</i>	50
					8	<i>R. necatrix</i>	100
			R terciaria con corteza	20-40	7	<i>V. albo-atrum</i>	25
					1	<i>F. oxysporum</i>	50
					8	<i>R. necatrix</i>	50
			R terciaria sin corteza	20-40	7	<i>V. albo-atrum</i>	25
					15	<i>F. oxysporum</i>	50
13	Tetela 7	4	Tallo	100	12	<i>F. oxysporum</i>	80-100

*R= Raíz, **T= Tallo, ***C= Corona

2.3.6. Identificación morfológica

A nivel de género

Las colonias con pigmentación rosa, púrpura, blanco amarillento y blanco presentaron microconidios pequeños, hialinos y elípticos en falsas cabezas; macroconidios hialinos, alargados, puntiagudos y ligeramente curvados; además presentaron clamidosporas globosas, intercalares o terminales. Estas características concuerdan con las mencionadas por Barnett y Hunter (1998), Domsch y Gams (1980) y Booth (1971), correspondientes al género *Fusarium* sp.

La pigmentación blanco-amarillento (y amarillo al reverso) produjo dos tipos de fialides: una tipo verticilada como *Verticillium* y otra como la de *Penicillium* (penicilada) en la misma colonia. Los conidios fueron unicelulares agrupados en

falsas cabezas. Estas características corresponden a las descritas por Domsch y Gams (1980) para el género *Gliocladium* sp.

El crecimiento lento, colonias blanco-grisáceo, produjeron conidios elipsoides a cilíndricos hialinos unicelulares, producidos en conidióforos hialinos, cortos y ramificados en forma verticilada, por lo que corresponde al género *Verticillium* sp. según Barnett y Hunter (1998) y Domsch y Gams (1980).

La coloración blanco-crema, oscuro en el centro, y los hinchamientos piriformes a nivel de los septos en hifas coincide con las características señaladas por Domsch y Gams (1980) para *Dematophora* sp., el anamorfo de *Rosellinia* sp.

A nivel de especie

Fusarium spp.

Aunque se obtuvieron varios tipos de pigmentación y formas de crecimiento de las colonias (Figura 2.23 y 2.25), al realizar las mediciones de los micro y macro conidios, clamidosporas, así como definir el tipo de fiálides se enmarcaron en dos especies de acuerdo a la descripción de Boot (1971) y Domsch y Gams (1980): *F. oxysporum* (Scheld.) Zinder y Hansen, y *F. solani* (Mart.) Apely Ws. Zinder y Hansen (Cuadro 2.9).

Cuadro 2.9. Características morfológicas de *Fusarium* spp.

Especie	Microconidios	Macroconidios	Clamidosporas	Fiálides
<i>F. oxysporum</i>				
1	6-10 x 2.8-3	35-40 x 3.5-4.4	9.5-12.5	Monofialides simples
2	5-12 x 2.2-3.5	27-46 x 3-5	5-15	Monofialides simples
3	5-12 x 2.3-2.5	27-46 x 3.0-4.5	5-15	
<i>F. solani</i>				
1	9-13 x 2.5-3.5	40-45 x 5-5.5	8.4-9.2	Monofialides simples
2	8-16 x 2-4	35-55 x 4.5-6	8-10	Monofialides simples
3	8-16 x 2-4	28-42(-65) x 4-6	6-10	

1. Rango de mediciones de 25 estructuras de cada aislamiento obtenido en campo.
2. Medidas señaladas por Booth (1971).
3. Medidas señaladas por Domsch y Gams (1980).

Los aislamientos de la primera especie fueron microconidios unicelulares, de forma elipsoidal a reniforme, hialinos, formados en falsas cabezas; macroconidios con tres a cinco septos, con la célula apical atenuada y célula basal en forma de pie bien diferenciada; fiálides simples y cortas; y clamidosporas solitarias o en pares (Figura 2.25), similar a lo descrito por Booth (1971) y Domsch y Gams (1980) para *F. oxysporum*. Aunque la pigmentación de las colonias fue diversa (Figura 2.23) y las referencias sólo mencionan de rosa pálido, violeta y salmón, las estructuras no fueron diferentes para este grupo de aislamientos.

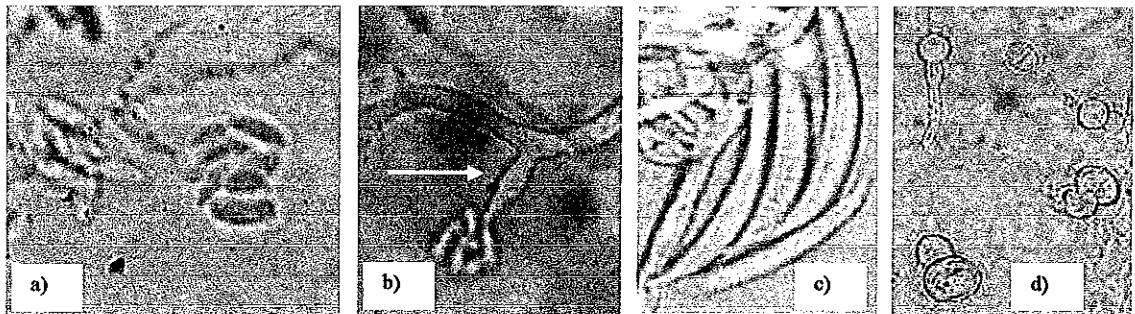


Figura 2.25. *F. oxysporum*. a) Microconidios en falsas cabezas, b) detalle de la fiálide corta, c) macroconidio, d) clamidosporas solitarias o en pares. Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.

La segunda especie (*F. solani*) se pigmentó de color blanco-crema a blanco-amarillento, con los bordes naranja (Figura 2.26). Los microconidios fueron abundantes, hialinos, elipsoidales y unicelulares; macroconidios cilíndricos principalmente de puntas redondeadas (célula basal tenue forma de pie) hialinos con cuatro a cinco septos; monofialides simples y largas; clamidosporas solitarias y en pares, similar a lo descrito por Booth (1971) y Domsch y Gams (1980), variando únicamente la pigmentación ya que señalan coloración casi siempre blanca y sin los bordes naranja.

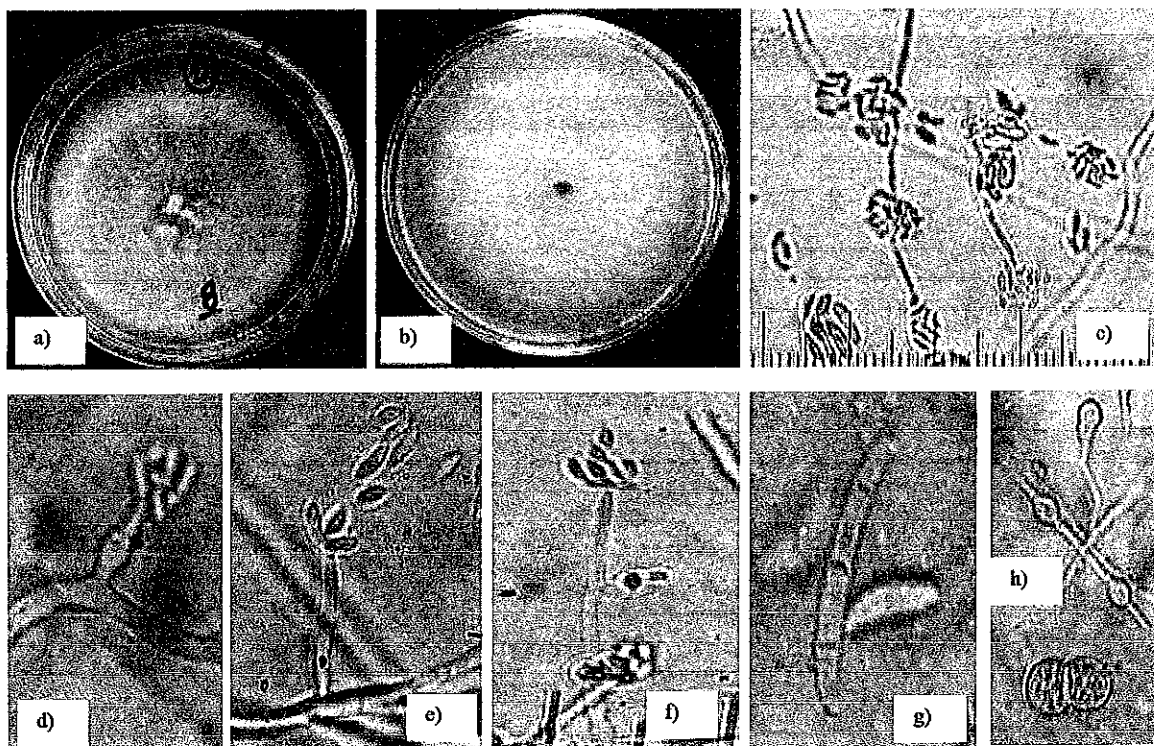


Figura 2.26. *F. solani*. a) Colonia con pigmentación naranja en los bordes, b) reverso de la caja Petri con medio EMA, c) microconidios en falsas cabezas, d), fiálide corta de *F. oxysporum*, e) y f) fiálides largas de *F. solani*, g) macro y microconidio, h) clamidosporas. . Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.

***Verticillium* sp.**

Según la literatura, *V. dahliae* (Kleb) y *V. albo-atrum* (Reinke y Berthold), se caracterizan por conidióforos delgados, hialinos, con fiálides ramificadas verticiladamente, y los conidios hialinos, elipsoides subcilíndricos, generalmente unicelulares, producidos apicalmente o en pequeñas cabezuelas; ambas especies se diferencian porque la primera forma microesclerocios hialinos, pardo oscuro o negros dentro del medio; y colonias blancas-crema a crema a negra con la edad (Figura 2.27). El aislamiento en estudio no formó microesclerocios ni clamidosporas, por lo que concuerda con las características señaladas por Romero (1993), CAB Internacional (1998) y Gubler (2000) para *V. albo-atrum* (Cuadro 2.10).

Cuadro 2.10. Características morfológicas de *Verticillium* spp.

<i>Verticillium</i> spp.	Tamaño de colonias	Color de colonias	Conidióforo	Conidios	Microesclerocios/ clamidosporas
Aislamiento en estudio	3.5 cm en 10 días	Blanco grisáceo	Erecto	Cortos, hialinos, unicelulares, elipsoides a cilíndricos. 4.5-6.5 x 2.5-3.5 µm.	Ausentes
<i>V. albo atrum</i> Domsch y Gams (1980)	2.5 cm de diámetro en 10 días a 5.8 cm de diámetro en 15 días	Primero de blanco a gris, flocoso y blanco a crema al reverso, pero después de 2-3 semanas se torna crema oscuro a negro en el centro.	Erectos, hialinos	Conidios elipsoides a cilíndricos, cortos, hialinos, unicelulares, ocasionalmente un septo. 3.5-10.5 (12.5) µm x 2-5 µm.	Microesclerocios y clamidosporas ausentes.
<i>V. dahliae</i> Romero, 1993; CAB International, 1998; Gubler, 2000.				2.5-8 x 1.4-3.2 µm.	Produce microesclerocios

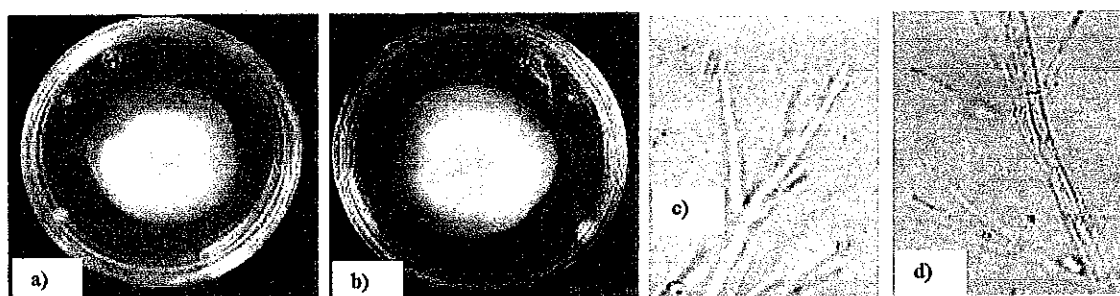


Figura 2.27. *V. albo-atrum*. a) pigmentación blanca, colonia con 8 días de edad b) reverso de la caja petri, c) y d) fiálides y verticiladas y microconidios. Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.

***Gliocladium* sp.**

La pigmentación de la colonia es blanco a crema al frente y amarillo al reverso de la caja Petri (Figura 2.28). A la cuarta semana colonias se avejuntaron pero el medio aún fresco. Las características morfológicas del aislamiento en estudio

son similares a las descritas por Domsch y Gams (1980) para la especie *G. roseum* (Bainier), en el cuadro 2.11 se resumen dichas similitudes.

Cuadro 2.11. Características morfológicas de *Gliocladium sp.*

<i>Gliocladium roseum</i>	Tamaño de colonias	Color de colonias	Conidióforo	Conidios
Aislamiento en estudio	3.5 cm en 10 días	Blanco-crema, amarillo al reverso	Tipo <i>Verticillium</i> y <i>Penicillium</i>	Hialinos, 3.2-4.6 x 4.0-5 µm
Domsch y Gams (1980)	2.4 – 3.5 cm de diámetro en 10 días.	Blanco, rosa o salmón; al reverso amarillo o salmón.	Los conidioforos primarios divergentes se ramifican tipo <i>Verticillium</i> , conidios en cabezas separadas. Los conidioforos secundarios , densamente penicilados (tipo <i>Penicillium</i>), conidios en masa viscosa (ambos tipo de conidioforos en la misma colonia).	En ambos tipos de conidioforos son alargados, asimétricos, ápice oblicuo redondeado, la base ligeramente sobresaliente, hialinos o rosáceos en masa. De 5-7.5 x 2-3.5 µm.

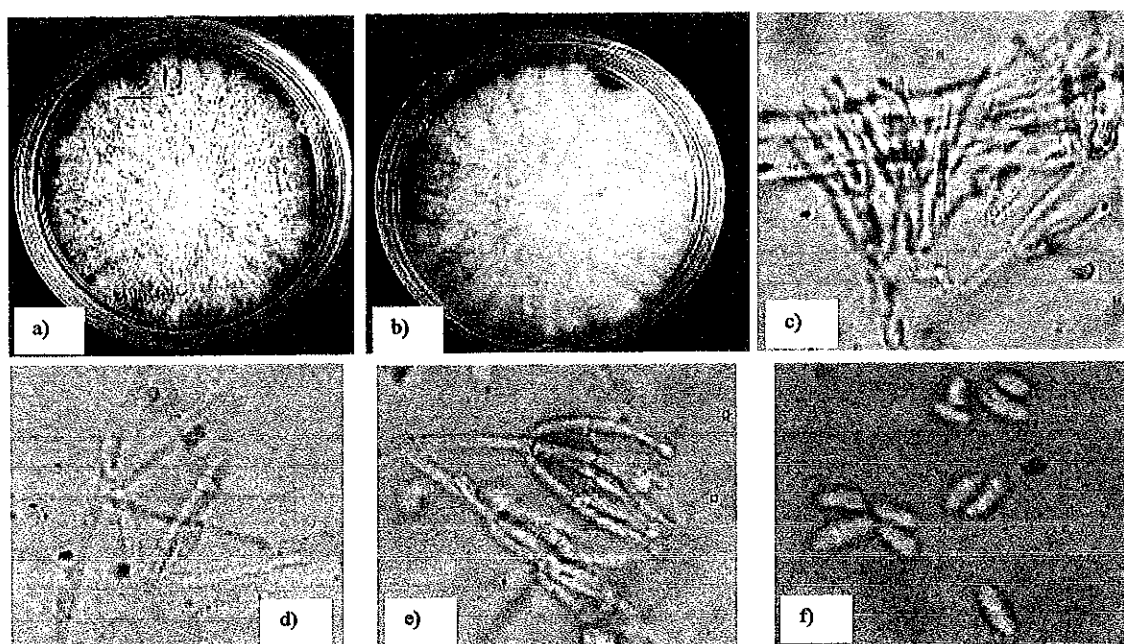


Figura 2.28. a) *G. roseum*, pigmentación blanca-crema de frente y b) amarillo al reverso, c) dos tipos de conidióforos, verticilados y penicilados, d) conidioforo tipo *Verticillium*, e) conidioforo tipo *Penicillium*, f) los conidios son alargados en ambos tipos de conidioforos. . Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.

***Dematophora* sp.**

El aislamiento produce colonias de color blanco, produce micelio compuesto por hifas lisas y otras con hinchamientos piriformes a nivel de los septos, microsclerocios negros y dispersos que tienden a unirse y formar capas microesclerociales (Figura 2.29). Estas características morfológicas concuerdan con las descritas por Sivanesan y Holliday (1972), y Romero (1993) para la especie *Dematophora necatrix* (R. Karting). En el cultivo no se formaron conidios.

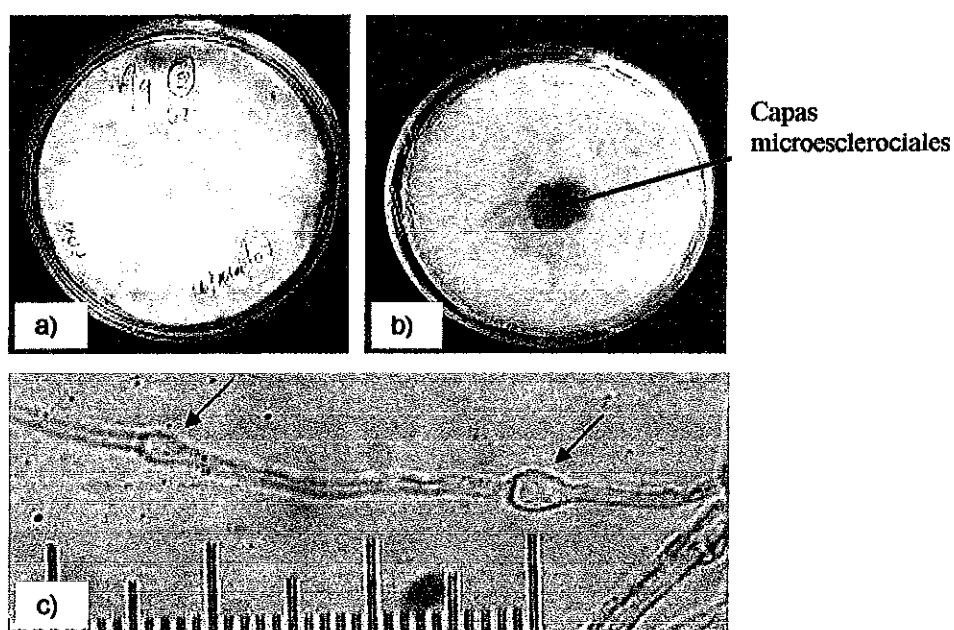


Figura 2.29. *Dematophora* sp. a) Colonia color blanco, b) capa microesclerocial vista al reverso de la caja Petri, c) hinchamientos piriformes a nivel de los septos. Las fotografías de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.

2.3.7. Identificación molecular

Extracción de DNA

El DNA de los 24 aislamientos (los 13 de campo y 11 de la prueba de patogenicidad de los capítulo 3 y 4) tuvo un peso molecular de 12.2 Kilobases (Kb), revelado en el gel de agarosa fue el adecuado para la amplificación del fragmento ITS (Figura 2.30 y 2.31).

obtuvieron índices de similaridad de 100% para las especies de *F. oxysporum* y *F. solani*, 99.4% para *G. roseum*, 98 % para *Dematophora* sp. alineada con *Rosellinia necatrix* (*D. necatrix*, anamorfo), y el aislamiento identificado morfológicamente como *V. albo-atrum* se alinea en 100% pero con la especie *V. dahliae*. Según Romero (1993), CAB Internacional (1998) y Gubler (2000) morfológicamente estas especies se diferencian porque *V. albo-atrum* no produce microesclerocios, y el aislamiento en estudio no los produjo, de ahí que se clasificara en esta especie, y no como *V. dahliae*.

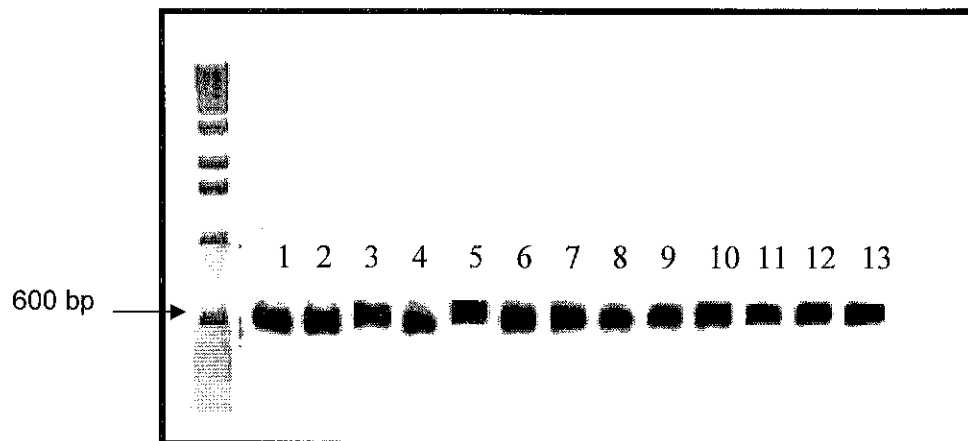


Figura 2.32. Gel de agarosa del producto de PCR, las bandas de las regiones ITS de 600 pares de bases. 1) *F. oxysporum*, 2) *F. oxysporum*, 3) *F. oxysporum*, 4) *F. solani*, 5) *F. oxysporum*, 6) *G. roseum*, 7) *V. albo-atrum*, 8) *Dematophora* sp. 9) *F. oxysporum*, 10) *F. oxysporum*, 11) *F. oxysporum*, 12) *F. oxysporum*, 13) *F. oxysporum*. Primera columna = marcador.

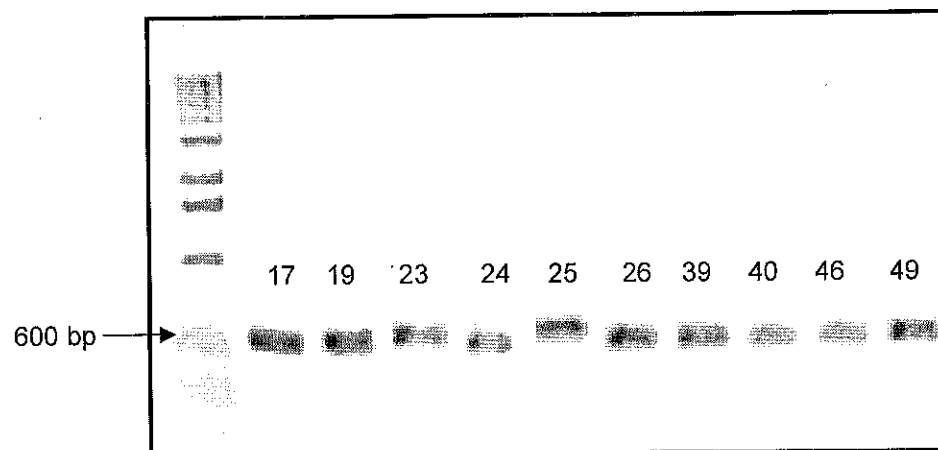


Figura 2.33. Gel de agarosa del producto de PCR, las bandas de las regiones ITS de 600 pares de bases. 17, 19, 23, 24, 25, 26, 39, 40, y 46= *F. oxysporum*. 49)= *F. solani*. Primera columna = marcador.

Cuadro 2.12. Caracterización molecular por PCR-ITS^a de genes ribosomales rRNA de 24 hongos aislados de raíz, corona y tallo de árboles y plántulas de duraznero, y comparación de sus secuencias con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Aislamiento	Identificación Morfológica	No. de N°	Comparación de secuencia en NCBI (alineamiento)	Valor de comparación ^b	Índice de similitud ^c	No. de Acceso NCBI	Origen geográfico
PP-1-1	<i>F. oxysporum</i>	508	<i>F. oxysporum</i>	939	100	EF495237	China
PP-2-2	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EU161242	México
PP-56-3	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. oxysporum</i>				
PP-4-4	<i>F. solani</i>	533	<i>Nectria haematococca</i> (<i>F. solani</i>)	985	100	AM412642	España
PP-5-5	<i>F. oxysporum</i>	503	<i>F. oxysporum</i>	929	100	EU161242	México
PP-57-6	<i>Gliocladium roseum</i>		<i>G. roseum</i>				
PP-58-7	<i>Verticillium albo-atrum</i>		<i>V. dahliae</i>				
PP-8-8	<i>Dematophora</i> sp.	551	<i>Rosellinia necatrix</i> (<i>Dematophora necatrix</i>)	970	98	EF026117	Taiwan
PP-9-9	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EU161242	México
PP-59-10	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. oxysporum</i>				
PP-11-11	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EU161242	México
PP-12-12	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EF495237	China
PP-60-13	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. oxysporum</i>				
PP-17-17	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EU161242	México
PP-19-19	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EF495237	China
PP-23-23	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EU161242	México
PP-24-24	<i>F. oxysporum</i>	505	<i>F. oxysporum</i>	933	100	EU161242	México
PP-61-25	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. oxysporum</i>				
PP-26-26	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EU161242	México
PP-39-39	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EU161242	México
PP-63-40	<i>F. oxysporum</i>		<i>F. oxysporum</i>				
PP-46-46	<i>F. oxysporum</i>	509	<i>F. oxysporum</i>	941	100	EU161242	México
PP-49-49	<i>F. solani</i>	525	<i>F. solani</i>	965	100	NECIT5B	USA

^aPolymerase Chain Reaction – Internal Transcribed Spacer (siglas en inglés). ^bNucleótidos. ^canamorfo. ^dvalores generados por el programa de DNASTAR. NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/.

2.4. CONCLUSIONES

1. Los síntomas de la parte aérea: amarillamiento, clorosis, frutos pequeños, muerte descendente de ramas, gomos en tallo, y muerte de los durazneros en el estado de Morelos, corresponden a los daños en la raíz, debido a la necrosis, pudrición seca y taponamiento de los haces vasculares, causados por la invasión de hongos en dichos tejidos.
2. Los síntomas descritos concuerdan con lo señalado para los hongos aislados: *F. oxysporum*, *F. solani*, *Gliocladium roseum*, *Verticillium albo-atrum* y *Dematophora* sp.
3. De muestras de raíz primaria y secundarias con síntomas de necrosis color café claro a rojizo y café oscuro en haces vasculares, observados como círculos en cortes transversales y en forma de vetas en cortes longitudinales y pudrición seca se aisló a *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Gliocladium roseum*, y *Verticillium albo-atrum*.
4. De pudrición seca y necrosis en forma irregular en raíces secundarias se aisló a *Dematophora* sp.
5. De la corona, con síntomas de pudrición seca y presencia de micelio blanquecino sobre la superficie y entre la corteza se aisló *Fusarium oxysporum*, *F. solani*.
6. De los mismos síntomas anteriores pero sin el micelio blanquecino se aisló a *Gliocladium roseum*.
7. De tallo, con necrosamiento de haces vasculares con coloración café claro a oscuro se aisló únicamente a *Fusarium oxysporum* y *F. solani*.
8. La caracterización molecular comprobó la identificación morfológica de los hongos aislados, con alto índice de similitud de acuerdo a la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para *F. oxysporum* y *F. solani* (100 %), *G. roseum* (99.4%), y aunque también alta (100%) para *Verticillium dahliae*, morfológicamente se

clasificó la especie como *albo-atrum* debido a que no formó microesclerocios, estructura distintiva de estas especies.

9. Fue bajo el índice de *Dematophora* sp. (98%) con *Rosellinia necatrix* (*Dematophora necatrix*, anamorto), pero morfológicamente se comprobó la identificación a género por la característica distintiva de: en hifas, formación de hinchamientos piriformes a nivel de los septos. Debido a que no se formaron conidios y tampoco conidióforos en las condiciones de cultivo usadas, se deja sólo como *Dematophora* sp.

2.5. LITERATURA CITADA

- Abdou, Y. A., O. M. Mousa, and A. M. Abd-El-Malek. 1982. Studies on seedling decline of stone fruits. Egyptian Journal of Phytopathology 14: 93-102.
- Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. Phytopathology 82:828-832.
- Aponte, A., A. Rondón, Z. Suárez, M. López, y R. Solórzano. 2001. Etiología y manejo integrado de la secazón o muerte repentina del duraznero en Aragua y Miranda. In: Memorias del XII Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay, 14-16 de noviembre. p.79.
- Barnett, H.L., and B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. U.S.A. 218 pp.
- Booth, C. The Genus *Fusarium*. 1971. The Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 pp.

Coletto, M. J. M. 1995. Crecimiento y desarrollo de las especies frutales. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp: 21-29.

CAB International. 1998. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 255.

Casas, C. A., y B. E. Casas. 1999. Análisis de suelo-agua-planta y su aplicación en la nutrición de cultivos horticolas en la zona peninsular. 2ª edición. Caja Rural de Almería. España. 238 pp.

CESAVERP. 2006. Manejo integrado del cultivo de durazno. (Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Puebla. 34 pp.

Corazza, L., and G. Chilosì. 1986. Behaviour of some stone fruit rootstocks towards *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale* 11: 113-116.

Diccionario de Especialidades Agroquímicas (DEA). 2006. Thomson PLM. México.

Díaz, M. D., and J. Martínez. 1988. Peach production in Mexico. In: The peach. Norman, C. F. and S. B. Wayne (Eds.) Somerset Press, Inc. U.S.A. pp: 134-139.

Domsch, K. H., and W. Gams. 1980. Compendium of soil fungi. Vol 1. APS Press, St Paul Minnesota. 646 pp.

Elias, R. R., J. G. Reyes, y M. J. Aquino. 2007. Identificación y propuesta de manejo de enfermedades de raíz del durazno en el sur del Estado de México. Fundación Salvador Sánchez Colín. Coatepec Harinas, Edo. De México.

Enciclopedia de los municipios de México. 2005. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Gobierno del Estado de Morelos.

- Gubler, W. D. 2000. Marchitamiento por *Verticillium*. In: Plagas y enfermedades de los frutales de hueso. Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu, y J. K. Uyemoto (Eds.). The American Phytopathological Society. p. 40-41.
- INEGI. 2005. Mapas Anuario Estadístico de Morelos. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México. 17 p.
- Hartill, W. F. T., and P. G. Broadhurst. 1989. *Fusarium avenaceum* as a pathogen of stone fruit in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 17(3): 293-295.
- Haygood, R. A., C. H. Graves, and W. H. Ridings. 1986. *Phytophthora* root rot and stem canker of peach trees in Mississippi. Plant Disease. 70:866-868.
- Hine, R.B. 1961. The role of fungi in the peach replant problem. Plant Disease Reporter. 45 (6): 462-465.
- Jailoux, F., and G. Froidefond. 1979. Differential action of five fungicides on the fungal mycoflora of peach shoots and leaves. Phytatie-Phytopharmacie 28 (4): 215-226.
- Junta de Extremadura (JE). 1992. Interpretación de análisis de suelo, foliar y agua de riego. Consejo de abonado (normas básicas). Mundi Prensa. España. 280 pp.
- Kanchavell, Z. S. 1997. *Cylindrocarpus* dieback of fruit trees. Zashchita i Karantin Rastenii 10: 33.
- Lee, I. M., R. Hammond, R. E. Davis, and D. E. Gundersen. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopatology 83:834-842.

- Namoradze, I. I. 1973. The fungus *Fusarium* causing root rot of peach. Trudy Instituta Zashchity Rastenii. Gruz. SSR 24:240-243.
- Namoradze, I. I. 1975. Effect of different temperatures on the growth and development of *Fusarium* species isolated from the roots of peach. Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruz. SSR 27: 153-157.
- Nycepier, A. P., and S. A. Lewis. 1984. Incidence of *Fusarium* and *Pythium* spp. in peach feeder roots as related to dibromochloropropane application for a control of *Criconeumella xenoplax*. Plant Disease 68(6): 497-499.
- Pérez, G. S. 1990. Manual para cultivar duraznero. Edit. Limusa. México. 108 p
- Pérez, G. S. 1995. Dinámica en la adopción de variedades de duraznero, ciruelo y albaricocque en México. Memorias de la primera Reunión nacional e internacional sobre producción de durazno, chabacano y ciruelo. Querétaro y Zacatecas. Universidad Autónoma de Querétaro. México. pp: 45-59.
- Rodríguez, A. J., y B. W. Sherman. 1995. Nuevas variedades de duraznos de pulpa firme para zonas subtropicales y de invierno moderado. In: Memorias de la primera Reunión Nacional sobre Producción de durazno, chabacano y ciruelo. Querétaro y Zacatecas, México. pp 72-75.
- Rodríguez, R., y E. Hernández. 2004. *Mucor* foliar spot and mycoflora in stem and root lesions of peach. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 88 (3-4): 155-160.
- Romero, C. S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo 347 p.

Rondón, A. 1990. Enfermedades de los frutales en Venezuela. Maracay. Ven, Instituto de Investigaciones Agronómicas, CENIAP-FONAIAP, 96 p (Serie B Nº 9).

Rozsnyay, Z. D., M Hevesi, Z. Klement, and L. Vajna. 1992. Biological control against canker and dieback diseases of apricots. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica Vol. 27: 551-556.

Sinclair, W.A., H. H. Lyon, and W. T. Johnson. 1987. Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press. Japan. 574 p.

Sipahioğlu, H. M., S. Demir, A. Myrta, M. Al-Rwahnih, B. Polat, L. Schena, M. Usta, A. Akkopru, M. Selcuk, A. Ippolito, and A. Minatra. 2006. Viroid, phytoplasma, and fungal diseases of stone fruit in eastern Anatolia, Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 34: 1-6, 28.

Sivanesan, A. and P. Holliday. 1972. *Rosellinia necatrix*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. Nº 352. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra.

Smith, M. L., J. N. Bruhn, and J. B. Anderson. 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. Nature 356:428-431.

Sotomayor, S. C. 1997. El cultivo del duraznero. In: Chile Agrícola v. 22(229). Chile. pp: 386-389.

Suárez, Z. C., A. Rosales, A. Aponte, A. Rondón, A. Bolívar y R. Crozzoli. 1999. Avances sobre la problemática fitopatológica del duraznero en el Municipio Tovar del estado Aragua. In: Memorias del XVI Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto 14-18, noviembre. (Memorias, p 85).

Sumbali, G., and R. S. Mehrotra. 1981. Influence of post-harvest fungal infections on the phenolic contents of apple, pear and peach fruits. National Academy Science Letters, 4(10): 393-396.

Sztejnberg, A., and Z. Madar. 1980. Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white root rot disease in fruit trees. Plant Dis. 64:662-664.

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

Wilcox, W. F., and M. A. Ellis. 1989. *Phytophthora* root and crown rots of peach trees in the eastern Great Lakes region. Plant Disease 73:794-798.

Zegbe, D. J., J. C. Mena, A. R. Rumayor, L. T. Reveles, y G. Medina G. 2005. Prácticas Culturales para Producir Durazno criollo en Zacatecas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Zacatecas. Publicación especial No. 15. 82 p.

Wu, Y. Q., Y. R. Wu, and L. Y. Chen. 1982. A preliminary study of peach warty bark. Shanghai Agricultural Science and Technology 5: 29-30.

www.senasica.sagarpa.gob.mx

SIACON 2004: <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/sistemas/siacon/SIACON.html>

CAPITULO III. AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO, RAMAS, AMARILLAMIENTO, MARCHITEZ Y MUERTE DE ARBOLES DE DURAZNO DE 1.5 AÑOS.

3.1. INTRODUCCIÓN

En este Capítulo el objetivo principal fue demostrar los postulados de Koch a través de la patogenicidad de los hongos aislados en Capítulo II de árboles enfermos y colectados en los municipios de Ocuilco y Tetela del Volcán, Morelos. Otro objetivo fue monitorear algunos aspectos epidemiológicos del desarrollo de la enfermedad por inoculaciones en invernadero como: efecto en el crecimiento, incidencia, severidad y datos climatológicos (temperatura ambiental, humedad relativa, y temperatura del suelo).

3.2. MATERIALES Y METODOS

3.2.1. Preparación del material vegetal

2 septiembre, 2006

1. 50 árboles de 1.5 años de edad, ubicados en bolsas de plástico negro y con altura promedio de 100 cm, injertados con la variedad Diamante Especial en un patrón criollo de la región (Figura 3.1), producidos comercialmente en viveros del municipio de Ocuilco, Morelos, se compraron y trasladaron a los invernaderos del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.



Figura 3.1. Plantas de 1.5 años antes de ser preparadas para la inoculación.

2 de noviembre, 2006

2. Los árboles se mantuvieron en observación en invernadero durante dos meses, después se les cambió el sustrato.

3. El nuevo sustrato utilizado fue una mezcla de dos partes de suelo con textura arcillo-arenosa y una de hojarasca (Figura 3.2).

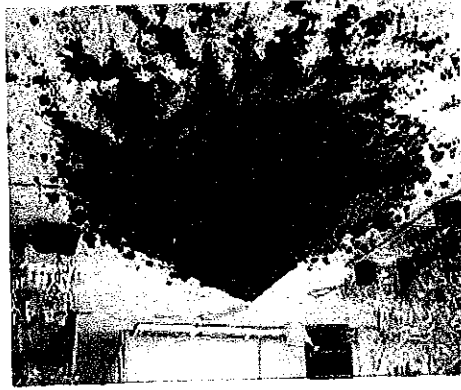


Figura 3.2. Mezcla utilizada para el cambio de sustrato.

4. La mezcla anterior se desinfectó con Metam sodio (Vapam®) en dosis de 1.5 L m². Este se aplicó con regadera y se colocó una cubierta plástica

durante 48 h (Figura 3.3). A los siete días se ventilo y removió todo el suelo.



Figura 3.3. Esterilización del sustrato con Metam Sodio.

5. Se quitó el sustrato original de cada maceta con agua corriente en recipientes de 20 L de agua, sumergiendo cada planta sin la bolsa las veces necesarias hasta eliminar todo el suelo adherido a las raíces.

Desinfestación de raíces

6. Se aplicó un tratamiento de desinfestación a las raíces desnudas de cada planta (Figura 3.4).



Figura 3.4. Raíces sin desinfestar

7. Esto fue para cada planta en un recipiente de 20 L con hipoclorito de sodio al 1.5 % (Anexo 2.2) durante 10 minutos y un triple enjuague en agua purificada (tratada con filtros de arena sílica, carbón activado y luz ultravioleta (Figura 3.5).

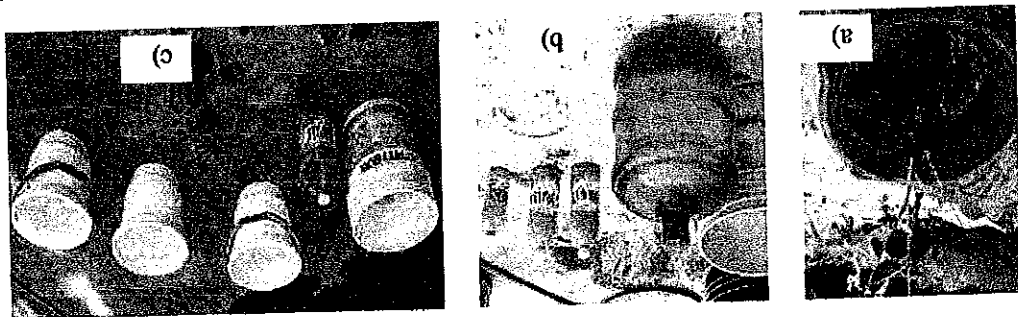


Figura 3.5. Desinfección de raíces con hipoclorito de sodio al 1.5%. a) Eliminación del sustrato en agua corriente, b) preparación de la solución de hipoclorito de sodio y c) triple lavado con agua purificada

8. Se colocaron los árboles con raíces desinfectadas en bolsas nuevas de 30 x 25 cm y se cubrieron con el nuevo sustrato desinfectado (Figura 3.6).

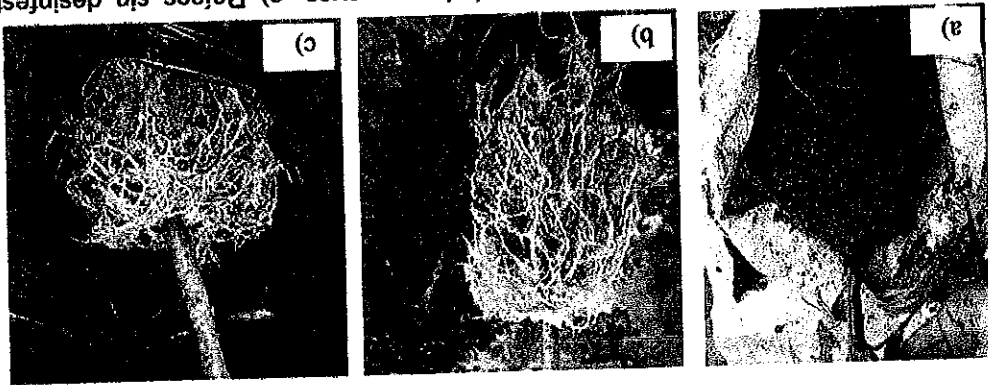


Figura 3.6. Colocación de las plantas en bolsas nuevas. a) Raíces sin desinfectar, b) aspecto de las raíces después del proceso de desinfección, c) colocación en la nueva bolsa y llenado con el sustrato desinfectado.

9. El mismo día del cambio de sustrato se podaron todas las plantas a una altura de 60 cm (Figura 3.7).

10. Se mantuvieron a temperatura de invernadero ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) con riegos cada 72 horas hasta el momento de su inoculación (90 días después).



Figura 3.7. Plantas de 1.5 años después de cambiarles el sustrato por nuevo desinfectado, desinfectar la raíz, y podarlas.

3.2.3. Preparación del inóculo

En total se inocularon 13 aislamientos fúngicos. La preparación del inóculo se realizó en el laboratorio 128 de Fitopatología del Colegio de Postgraduados.

Fusarium spp. y *Gliocladium roseum*.

a) Se inocularon los aislamientos previamente identificados como: *Fusarium oxysporum* (aislamientos 5B, 6D, 7D, 8D, 10E, 15A, 16C, 18D, 21C), *F. solani* (23D), y *Gliocladium roseum* (3D) y cuyo origen se describió en Cap. II, Cuadro 2.8.

b) Para incrementar el inóculo se utilizó semilla de millo color beige (*Panicum millicium*).

c) Las semillas (aproximadamente 50 mL) se depositaron en 22 matraces de 250 mL (2 matraces para cada aislamiento inoculado), se agregó agua destilada hasta la mitad del matraz y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos tres veces (una cada 24 h).

h) Para preparar el inóculo de este aislamiento se licuó el contenido (micelio) de 8 cajas Petri de 13 días de edad (dos colonias de 8.5 cm de diámetro, dos con 7.5 y cuatro con 7.0 cm). Se preparó 1 litro de esta solución.

***Dematophora* sp.**

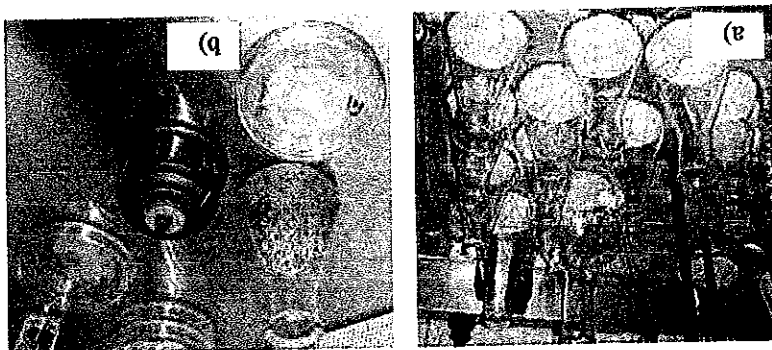
g) Los matraces con el medio líquido se mantuvieron en agitación a 160 rpm en condiciones naturales de laboratorio durante 72 h.

f) La mezcla se licuó y se depositaron 50 mL del homogenizado en seis matraces de 250 mL.

e) Este aislamiento No 13 se incrementó en medio líquido papa-dextrosa (Anexo 2.3 b). Se utilizaron 300 mL del medio, en el que se suspendió micelio y conidios del raspado de dos cajas Petri de colonias del hongo en PDA, y de 8 días de edad.

Verticillium albo-atrum

Figura 3.8. Preparación del inóculo con semillas de mijo. a) Llenado de matraces para esterilización de la semilla, b) inoculación de la semilla esterilizada.



d) La semilla esterilizada, y con humedad mínima, se inoculó (cada matraz) con 3 discos de medio EMA (Anexo 2.6)+ el hongo por aislamiento, con colonias de 8 días de edad (Figura 3.8).

Objetivo 1: Postulados de Koch

3.2.3. Inoculación (se realizó tres meses después del cambio de sustrato)

Se realizaron dos inoculaciones, con diferencia de 30 días entre ellas. Antes de la inoculación se causó un estrés hídrico a los árboles al suspender el riego por cuatro días. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, un total de 14 tratamientos (13 aislamientos y el testigo).

La preparación del inóculo se realizó en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar (Termo Forma®, modelo 1839).

Inoculación 1 (17 de febrero 2007):

Fusarium spp. *Gliocladium roseum* y *Verticillium albo-atrum*. La concentración de conidios de estos aislamientos se contaron con un hematocitómetro (Newbauer American Optical®). La suspensión se preparó en un matraz de 1 litro. Se tomaron gránulos de semillas de mijo colonizadas y con esporulación de los hongos y se vertieron con ayuda de una espátula esterilizada al matraz con 500 mL de agua destilada estéril (Figura 3.9), se agitó manualmente y se checo la concentración hasta ajustar 1×10^6 conidios.mL⁻¹. A cada planta se le agregó 250 mL de la suspensión con el inóculo.

Dematophora sp. Para este aislamiento (no produjo conidios) se licuaron 8 colonias en PDA de 10 días de edad en un litro de agua destilada estéril. De esta solución madre se tomó la cantidad necesaria para ajustar a 1×10^6 propágulos, 250 mL para cada planta. Se realizó al mismo tiempo que los aislamientos anteriores.

Figura 3.9. Preparación de las soluciones conidiales o propágulos.



Cada suspensión de inóculo preparado se guardó en refrigeración a 5° C hasta tener todos los litros para inocular, y se llevaron del laboratorio 128 de Fitopatología del Colegio de Postgraduados al invernadero de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo.

Al momento de la inoculación (al oscurecer a partir de 19:00 h) se realizaron tres agujeros en el sustrato alrededor del tallo de cada planta para herir las raíces. Esto se hizo con una varilla de hierro esterilizada (se impregnó en alcohol etílico de 96° y se flameó antes de herir cada planta) de 0.5 cm de diámetro y 30 cm de largo. Después se aplicó al suelo 250 mL de suspensión conidial en cada planta del tratamiento respectivo (1 L por tratamiento de cuatro plantas) (Figura 3.10).

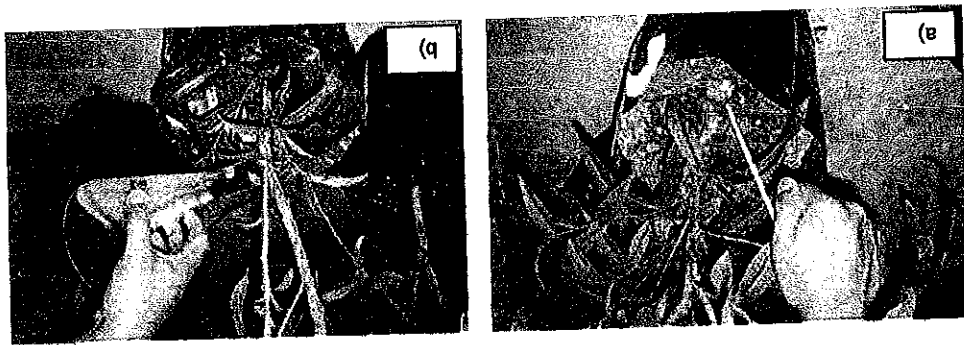


Figura 3.10. a) Herida a la raíz y, b) agregado de la solución conidial.

Inoculación II

Realizada en: 23 de marzo de 2007. Esta fue un mes después de la primera.

a) El procedimiento para obtener la concentración conidial fue la mencionado en la Inoculación I. Se utilizó una solución conidial de 8 x 10⁶. Las heridas a las raíces se realizaron con una navaja de punta aguda desinfectada, de 2 cm de ancho x 10 cm de largo, realizando 4 cortes a 8 cm de distancia, alrededor de la base del tallo (Figura 3.11).



Figura 3.11. Heridas a al raíz con navaja.

b) Adicionalmente a la inoculación con solución conidial se usó otra técnica.

Inoculación III.

c) **Esta se realizó el 28 de marzo de marzo de 2007, cinco días después de la segunda inoculación.**

d) Consistió en la inoculación al tallo basal con discos de 1 cm de diámetro de cada aislamiento en MEA y de 8 días de edad.

e) Primero se hicieron dos heridas opuestas cerca de la base del tallo, y de 1 cm de longitud entre la corteza y la madera y se colocó ahí el disco de medio (Figura 3.12).

h) En cada caso después de la inoculación el riego a los árboles fue cada 24-48 horas según se requería para mantener el suelo húmedo a capacidad de campo. Se agregó manualmente 250 mL de agua por planta en cada riego.

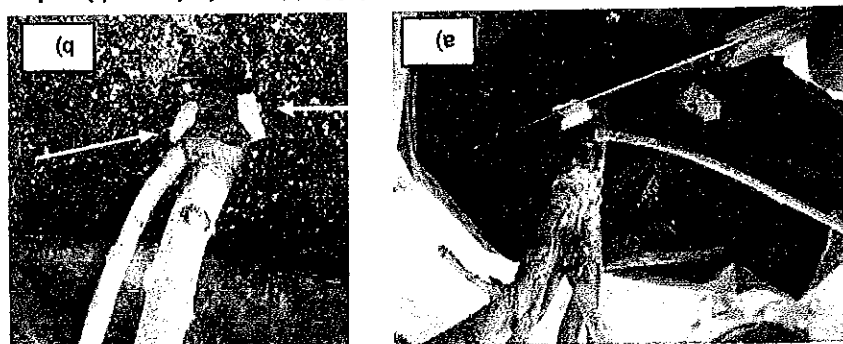
Figura 3.13. Cámara húmeda para la inoculación al tallo. a) Colocación del algodón rodeando el inóculo, b) humedecimiento con agua destilada estéril, c) colocación del plástico.



f) Se cubrieron éstos con algodón humedecido con agua destilada esterilizada, y esterilizados previamente a 15 libras de presión durante 15 minutos.

g) Después a manera de cámara húmeda se colocó plástico en forma de cono invertido en cada maceta, y cubriendo la porción del tronco inoculado hasta el nivel del suelo (Figura 3.13).

Figura 3.12. Detalle de la inoculación al tallo. a) Herida en la base, b) colocación de los discos de inóculo.



Testigos

A los testigos (cuatro plantas) únicamente se les adicionó una suspensión de 250 ml de agua destilada por planta y preparada con el lavado de semillas esterizadas para las inoculaciones I, y II. También se les hizo heridas con la varilla.

Para la inoculación III fueron discos de medio sin crecimiento fúngico y se colocaron en las heridas al tallo basal, y se les colocó la cámara húmeda igual que a las plantas inoculadas.

El grano inoculado sobranse se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos y desechó.

3.2.4. Evaluaciones de la parte aérea

Se evaluó cuantitativamente y sin muestreo destructivo, el efecto de las inoculaciones en la respuesta aérea de la planta por medición de los siguientes parámetros:

- a) crecimiento de los árboles (ver 3.2.4.1)
- b) incidencia (ver 3.2.4.2)
- c) severidad (ver 3.2.4.3)

Para ello se realizaron 10 evaluaciones, una cada 30 días a partir de la primera inoculación.

También se tomaron datos de clima dentro del invernadero con el uso del un aparato medidor automático con software programable (ver 3.2.4.4), y éstos fueron:

- a) temperatura ambiental,

- b) temperatura del suelo (sustrato por planta)
- c) humedad relativa ambiental
- d) humedad del suelo (esta sólo se mantuvo a capacidad de campo de $\pm 60\%$, y no se midió cuantitativamente con el aparato por estar desprogramada tal función).

Los datos de indicadores de crecimiento, incidencia y severidad se analizaron con el software SAS® Versión 8 (SAS Institute Inc., U.S.A.), se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para los 14 tratamientos (Cuadro 3.1). Se contó con la asesoría del MC. Luis Emilio Castillo Márquez, académico del Área de Estadística y Apoyo del Departamento de Parasitología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo.

Cuadro 3.1. Tratamientos analizados con el paquete estadístico SAS®.

Tratamiento	Aislamiento	Hongo
1	5B	<i>F. oxysporum</i>
2	6D	<i>F. oxysporum</i>
3	7D	<i>F. oxysporum</i>
4	8D	<i>F. solani</i>
5	10E	<i>F. oxysporum</i>
6	13D	<i>G. roseum</i>
7	13'	<i>Verticillium albo-atrum</i>
8	Ag	<i>Dermatophora</i> sp.
9	15a	<i>F. oxysporum</i>
10	16C	<i>F. oxysporum</i>
11	18D	<i>F. oxysporum</i>
12	21C	<i>F. oxysporum</i>
13	23D	<i>F. oxysporum</i>
14	TESTIGO	

3.2.4.1. Indicadores de crecimiento

Se tomó como indicadores de crecimiento de testigos sin inocular *versus* plantas inoculadas los siguientes parámetros por planta:

1. Altura de planta
2. Ancho de copa
3. Diámetro de tallo
4. Número de ramas total
5. Número de ramas muertas

Para esto se utilizó un flexómetro (Pretul®) y vernier (Germany®).

3.2.4.2. Incidencia

Para la evaluación de la incidencia se utilizó la fórmula:

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de árboles enfermos}}{\text{Número total de árboles del tratamiento}} \times 100$$

3.2.4.3. Severidad

Para evaluar el grado de severidad de la enfermedad (marchites, amarillamiento y muerte de las plantas) se utilizó la escala del 0 al 6 propuesta por Bloss *et al.* (1972); donde:

- | | | | |
|--------------|----------------------|-----------------|---------|
| 0=árbol sano | 1= 10 % de severidad | 2= 25 % | 3= 50 % |
| 4= 75 % | 5= 90% | 6=árbol muerto. | |

Los índices de severidad según la escala mencionada se convirtieron a porcentajes de infección de acuerdo a la fórmula de Townsend y Heuberg:

$$PI = \frac{\sum_{n=5}^i (n * V)}{Categoría_{mayor} * N} * 100 \dots \dots \dots (Townsend y Heuberg)$$

Donde:

PI = Porcentaje de infección
n = número árboles en cada categoría
V = valor numérico de cada categoría
N = número de árboles en la muestra

3.2.4.4. Datos climatológicos

Se tomaron datos climatológicos dentro del invernadero donde se llevó a cabo el experimento. Para los datos de temperatura ambiental, temperatura del suelo, humedad relativa, y humedad del sustrato, se utilizó un data logger Watch Dog® (modelo 450, de Spectrum Technologies Inc. U.S.A.).

Objetivos:

3.2.5. Evaluaciones de raíz

Reaislamientos. Se realizó en octubre de 2007, a los siete meses (210 días después de la última inoculación). Se seleccionó por tratamiento una planta de las inoculadas, y tésigo no inoculado) con síntomas aéreos visibles de la enfermedad en estudio.

a) Antes de desear el sustrato de cada planta se midió el volumen contenido en cada bolsa. Esto fue midiendo el largo, ancho y altura del cepellón, con lo que se obtuvo el volumen en cm³ (Figura 3.14.).



Figura 3.14. Volumen del cepellón al quitar la bolsa

- b) Se lavó cuidadosamente el sistema raíz en recipientes de 10 L de agua las veces necesarias para quitar todos los residuos de sustrato (Figura 3.15).

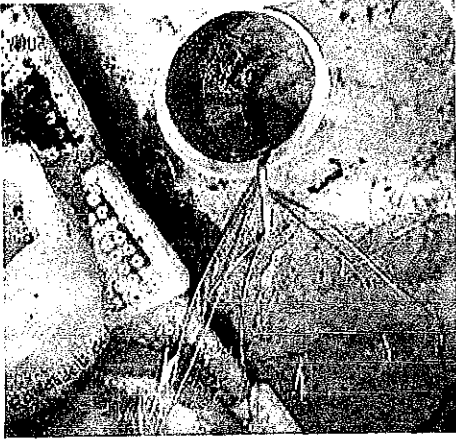


Figura 3.15. Lavado de la raíces en agua corriente

- c) El "volumen" del sistema raíz de cada árbol se obtuvo midiendo el alto, ancho y altura del cepellón al quitar el sustrato (previamente se hizo bosquejo dibujado en papel), con lo que se obtuvieron las medidas en cm^3 como indicativo de la afectación en el desarrollo de la raíz (Figura 3.16).

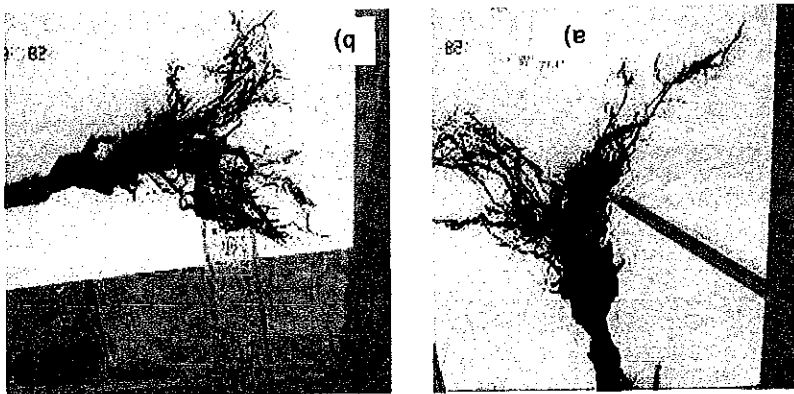


Figura 3.16. a) Obtención del área de la raíz, b) Obtención de la altura.

- d) Se tomaron fotografías comparativas del sistema raíz de todos los árboles procesados, esto fue con un triple y una regla, a una misma distancia y altura.
- e) El tallo y raíz principal de cada árbol fue abierto a la mitad con una navaja esterilizada para cada planta.
- f) Se midieron las lesiones internas de cada parte.
- g) Por planta se hicieron cortes de 0.5 x 0.3 cm del tejido con daños visibles, separándolos por raicillas, raíz principal, corona, y tallo.
- h) Se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 minutos. Después se enjuagó cinco veces y se secaron los trozos en papel absorbente esterilizado.
- i) Se sembraron cinco trozos en cada caja Petri con medio de cultivo EMA, y se incubaron en condiciones naturales de laboratorio.
- j) Los tallos y raíces que no se usaron para el reaistamiento se etiquetaron para material de Herbario Fitopatológico en el Colegio de Postgraduados.

3.2.6. Identificación morfológica y molecular

La identificación de los reaistamientos y conservación se hizo como en Capítulo II, apartado 2.2.10, 11 y 12, se secuenciaron al mismo tiempo con los aistamientos de campo (Capítulo II).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Preparación del material vegetal

Durante el tiempo de observación (dos meses) las plantas no mostraron ningún síntoma de enfermedades fungosas. Después del cambio de sustrato y desinfestación de raíces si hubo una ligera afectación en las plantas, ya que manifestaron una pérdida de turgencia y caída de hojas, que desapareció después de 10 días. Esto pudo ser causado por un efecto toxico del hipoclorito de sodio, además del estrés que se causó por el daño mecánico a las raíces. La recuperación se observó cuando emergieron hojas turgentes y vigorosas. El tiempo de recuperación que se dio fue de tres meses después del procedimiento de cambio de sustrato y fue el adecuado, ya que no hubo síntomas de fototoxicidad ni otra afectación en el momento de la inoculación.

Objetivo 1: Postulados de Koch

3.3.2. Preparación del inóculo

Con semillas de mijo. Con este procedimiento se obtuvo abundante micelio y conidios a 10 después de inocular las semillas, suficiente para la cantidad de solución conidial requerida por planta inocuada. Los resultados fueron satisfactorios para las aislamientos de *Fusarium oxysporum* (5B, 6D, 7D, 8D, 15A, 16C, 18D, 21C y 23D.), *F. solani* (8D), y *Gliocladium roseum* (13D). Los aislamientos de *Verticillium albo-atrum*, y *Dematophora* sp. no mostraron esporulación sobre las semillas inocuadas.

Medio líquido. Fue favorable para el aislamiento de *V.albo-atrum* (13'). Se logró la cantidad suficiente de inóculo (micelio y conidios) cuando se mantuvo el

medio de cultivo en agitación constante, con ahorro de tiempo de 10 días con respecto a mantenerlo estático.

Medio sólido. Fue favorable para el aislamiento de *Dematophora* sp. (Ag), lográndose la cantidad de inóculo requerida en 13 días. Creció más rápidamente en condiciones de oscuridad total: 8.2 cm de diámetro en oscuridad total y 6.2 cm en alternancia luz-oscuridad en medio PDA.

3.3.3. Inoculación

Inoculación I

No se observó ningún síntoma después de un mes de la inoculación. Se dedujo que las heridas realizadas a las raíces no fueron suficientes, porque no hubo el grado de daño a la raíz que favoreciera la penetración de los patógenos. Esto en base a que: las heridas en las raíces, ya sea naturales o inducidas favorecen a los hongos en la colonización de las plantas, según Dhingra y Sinclair (1987). Otro factor que se consideró importante fue la cantidad de inóculo, se consideró baja la concentración de 1×10^6 conidios/mL, por lo que se programó una segunda inoculación.

Inoculación II

Se observaron los primeros síntomas al mes de realizar esta segunda inoculación, y/o a los dos meses de la primera inoculación, y que consistieron en: clorosis, amarillamiento, defoliación y ramitas muertas, en comparación con los testigos que se mostraron vigorosos (se describen ampliamente los síntomas en el apartado 3.3.4.3).

Esto posiblemente por incrementar el grado de daño a la raíz con navaja y la cantidad mayor de inóculo.

Inoculación III

Paralelo a lo anterior, además, fue también importante la inoculación al tallo, ya que a los cinco días después de realizada se observó abundante micelio y esporulación cubriendo el disco de agar y la zona herida.

Los efectos de la inoculación para cada hongo en las plantas se analizan en el apartado de evaluaciones.

3.3.4. Evaluaciones de la parte aérea

3.3.4.1. Indicadores de crecimiento

Los resultados del análisis de varianza de los 14 tratamientos, así como la prueba de comparación de medias de Tukey, separando los datos por cada una de las 10 evaluaciones, revelaron que sí hubo diferencia estadística entre los diferentes tratamientos (Cuadro 3.2). En las variables altura de árbol y ancho de copa, fue manifiesta la diferencia a partir de la cuarta lectura (120 días de la inoculación), el diámetro de tallo en la quinta (150 días), y ramas muertas en la sexta evaluación (180 días). El número de ramas totales no tuvo diferencia significativa en ninguna de las evaluaciones de forma separada como las anteriores variables, lo que significa que la inoculación de los diferentes hongos no tuvo efecto en esta variable.

Considerando las medias de las 10 evaluaciones obtenidas por SAS para los 14 tratamientos se obtuvo lo siguiente:

Altura. Esta variable, con respecto al testigo y entre ellos únicamente fue estadísticamente diferente en el tratamiento 8, correspondiente a la colonia Ag (*Demathophora* sp.), pero no en el sentido de afectación en el crecimiento debido a que el testigo fue mayor en dicha variable, por lo que no se puede

señalar a la altura como reducción o afectación como lo señala Wehnt y Weaver (1972), quien reportaron a *Fusarium oxysporum* afectando el crecimiento en plantas de durazno en invernadero. El resto de los tratamientos tuvieron un comportamiento similar al testigo (Cuadro 3.2).

Ancho de copa. En esta variable la diferencia estadística para la mayoría de los tratamientos sí reveló reducción con respecto al testigo, a excepción del tratamiento 7, correspondiente a la colonia 13 (*Verticillium* sp.). En el orden de mayor a menor afectación resultaron los aislamientos de *Fusarium oxysporum* (18D, 7D, 23D, 21C, 5B), tratamientos 11, 3, 13, 12 y 1 respectivamente con 76.7 – 94.2 cm.

Los demás tratamientos fueron estadísticamente cercanos (96.7 a 106.4 cm) con respecto al testigo (115.3 cm) (Cuadro 3.2). El 2, 5, 9 y 10 fueron aislamientos de *F. oxysporum*, el 4 de *F. solani*, 6 de *G. roseum*, y 8 de *Dematophora* sp.

Díámetro de tallo. Estadísticamente no hubo efecto en esta variable.

Número de ramas total. En esta variable sí fue estadísticamente diferente con respecto al testigo sólo el tratamiento 8 del aislamiento de *Dematophora* sp. (Ag). Este tuvo el menor el número de ramas (24.1) que el testigo (35.4). Los demás hongos inoculados tuvieron 28.2 a 30.2 ramas. No hubo efecto para el tratamiento 9 que tuvo más ramas que el testigo.

Número de ramas muertas. *G. roseum* (tratamiento 6), *V. albo-atrum* (tratamiento 7), *F. oxysporum* (tratamientos 11 y 9), *F. solani* (tratamiento 4) fueron los hongos que afectaron de manera significativa las ramas de los árboles de mayor a menor grado respectivamente con respecto al testigo. *Dematophora* sp. (tratamiento 8) presentó el menor número de ramas muertas, y no fue diferente estadísticamente al testigo.

Los resultados inducidos por *Fusarium* sp. y *Verticillium* sp., concuerdan con los síntomas descritos por Hine (1961), Chandler *et al.*, (1962), Hendrix y Powell (1970), Pérez (1990), Sotomayor (1997), Suárez *et al.* (1999) y Aponte *et al.* (2001), en cuanto a la muerte de ramas, aunque no mencionaron comparaciones numéricas ni reportaron patogenicidad. Para *D. necatrix* no se reporta la muerte de ramitas (Sinclair *et al.*, 1987; Szejnberg, 1990), coincidiendo en cierto grado con lo encontrado en esta investigación. Tampoco reportaron patogenicidad.

Cuadro 3.2. Variables de crecimiento promedio evaluadas en la inoculación de hongos aislados de duraznero (datos tomados de febrero a diciembre de 2007).

No. de tratamiento	Aislamiento	Altura	Ancho de copa	Diámetro de tallo	No. ramas total	No. ramas muertas
1	<i>F. oxysporum</i> (5B)	91.9 b c d	92.2 c d	1.6 b	34.4 a b	2.8 a b c d e
2	<i>F. oxysporum</i> (6D)	98.6 b c	98.0 b c d	1.9 a	36.6 a b	2.7 a b c d e
3	<i>F. oxysporum</i> (7D)	88.4 c d	84.8 c d	1.6 a	28.7 b c	2.3 a b c d e
4	8D	89.1 c d	94.2 b c d	1.5 b	28.9 b c	3.0 a b c d
5	<i>F. oxysporum</i> (10E)	107.2 b	96.7 b c d	1.6 a b	28.8 b c	2.0 b c d e
6	<i>G. roseum</i> (13D)	90.5 b c d	106.4 b c	1.7 a b	35.9 a b	5.1 a
7	<i>V. alboatum</i> (13)	78.4 d	131.8 a	1.6 a b	30.2 b c	4.7 a b
8	<i>Dematophora</i> sp. (Ag)	127.5 a	98.2 b c d	1.6 b	24.1 c	1.0 d e
9	<i>F. oxysporum</i> (15A)	88.6 c d	103.7 b c	1.7 a b	40.5 a	3.0 a b c c
10	<i>F. oxysporum</i> (16C)	96.1 c d	96.1 b c d	1.7 a b	31.3 a b c	2.4 a b c d e
11	<i>F. oxysporum</i> (18D)	77.0 d	76.7 d	1.7 a b	28.2 b c	3.9 a b c
12	<i>F. oxysporum</i> (21C)	100.6 b c	90.5 c d	1.7 a b	30.6 a b c	2.6 a b c d e
13	<i>F. oxysporum</i> (23D)	88.3 c d	89.4 c d	1.7 a b	32.7 a b c	1.7 b c d e
14	TESTIGO	92.9 b c d	115.3 a b	1.4 b	35.4 a b	0.0 e

Valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.3.4.2. Incidencia

De acuerdo a los resultados de la prueba de Tukey, el porcentaje mayor de incidencia lo tuvo el tratamiento 2, correspondiente al hongo *Fusarium oxysporum*, aislamiento 6D, siendo el daño mayor y diferente significativamente con respecto a los tratamientos 3, 5, 7, 8 y al testigo absoluto. Los que no tuvieron diferencias estadísticas entre ellos pero sí con respecto al testigo, fueron los aislamientos 5B, 15A, 16C, 18D, 21C y 23D (correspondientes a *F. oxysporum*) 8D (*F. solani*), 13D (*G. roseum*). En otro grupo diferente a los anteriores y al testigo pero iguales entre sí fueron el 7D (*F. oxysporum*) y 10E (*F. oxysporum*). Los valores de incidencia de los aislamientos 13' (*V. albo-atrum*) y Ag (*D. necatrix*) fueron iguales estadísticamente al testigo, aunque este último tuvo 0 % de incidencia (Cuadro 3.3).

3.3.4.3. Severidad

Considerando los índices de severidad convertidos a porcentaje de infección resultó que el porcentaje mayor de infección lo tuvo el aislamiento 15A (*F. oxysporum*), aunque estadísticamente fue igual a 5B y 18D, que correspondieron a la misma especie, así como 8D (*F. solani*) y 13D (*G. roseum*) (Cuadro 3.3). Así mismo, solo los aislamientos 15A, 13D y 8D fueron los que mostraron los daños máximos y diferentes estadísticamente con respecto a los tratamientos 7, 8 y al testigo absoluto (Cuadro 3.3).

Los trabajos previos reportaron las especies de *F. oxysporum* y *F. solani* asociados a síntomas de pudrición de raíz, canchros en el tallo, muerte regresiva de ramas y gomosis, en Puerto Rico, pero no se reportó comprobada la patogenicidad (Rodríguez y Hernández, 2004). Si comprobaron como patógenas estas especies en EUA, pero no se señalaron datos de evaluación de la severidad (Nyczepir y Pusey, 1986).

Los aislamientos '13' (*V. albo-atrum*) y Ag (*Dematophora* sp.), fueron los de menor porcentaje de infección y aunque iguales según la prueba de Tukey sí fue mayor para *Verticillium* y se presentó a partir del tercer mes después de la inoculación, y la *Dematophora* sp. a los seis meses después de inoculado (Figura 3.17).

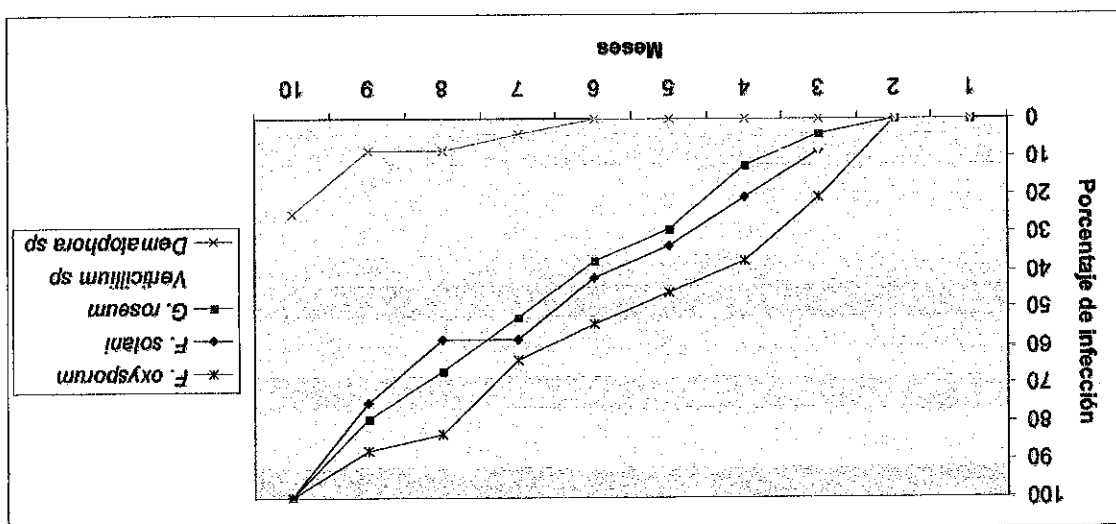
Cuadro 3.3. Porcentaje de incidencia y severidad en árboles de 1.5 años en promedios de 10 evaluaciones

Tratamiento*	Aislamiento	Incidencia	Severidad
1	5B	77.5 a, b	37.6 a
2	6D	80.0 a	34.6 a, b
3	7D	52.3 b	25.0 a, b, c
4	8D	72.5 a, b	39.6 a
5	10E	52.5 b	26.4 a, b, c
6	13D	70.0 a, b	38.2 a
7	13'	16.3 c	10.4 b, c, d
8	Ag	10.0 c	2.9 c, d
9	15a	77.5 a, b	49.3 a
10	16C	62.5 a, b	29.6 a, b
11	18D	73.8 a, b	41.0 a
12	21C	62.5 a, b	32.6 a, b
13	23D	62.5 a, b	33.9 a, b
14	TESTIGO	0.0 c	0.0 d

*Datos tomados de febrero a diciembre de 2007. Valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.3.4.3. Sintomas

Figura 3.17. Comparación del porcentaje de severidad aérea de los 13 aislamientos de *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. roseum*, *Verticillium albo-atrum*, y *Dematophora* sp. de marzo a diciembre de 2007 (de los diferentes aislamientos de *F. oxysporum* se tomó sólo el 15A en comparación con las demás especies)



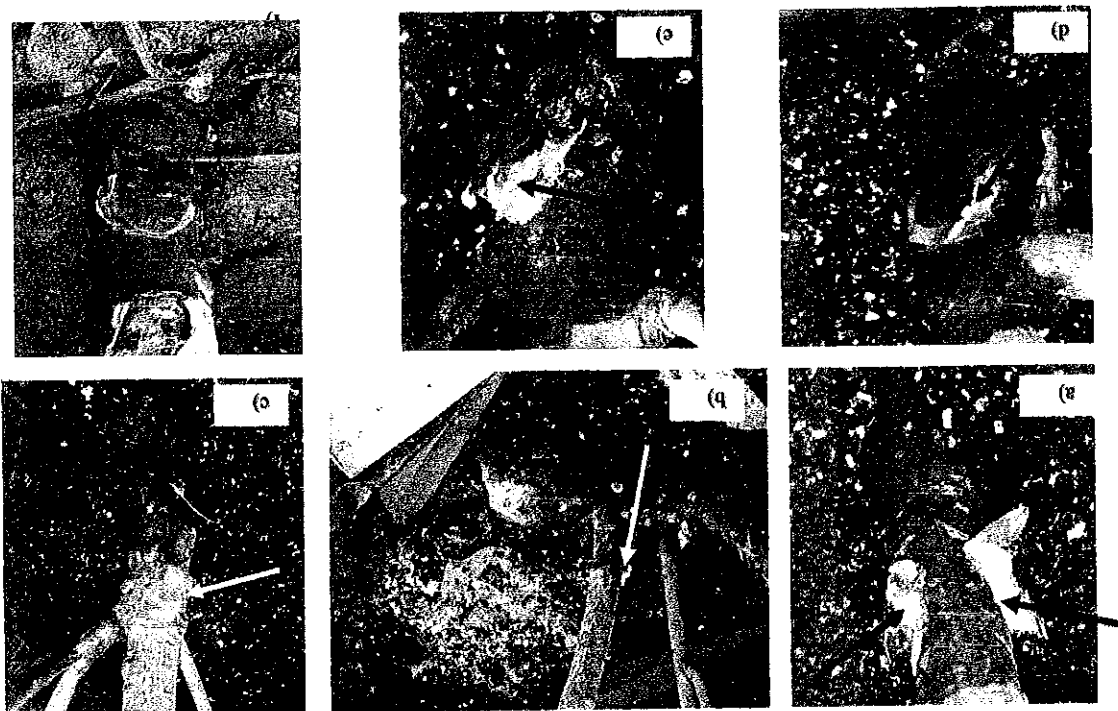


Figura 3.18. Esporulación de diferentes hongos en la inoculación por herida realizada al tallo. a) y b) *F. oxysporum* (aislamientos 6D y 15A), c) *Verticillium* sp., d) *F. solani*, e) *G. roseum*, f) Testigo, se observa el disco de medio de cultivo pero sin esporular. Cinco días después de la inoculación.

En el follaje, los síntomas iniciales de la enfermedad aparecieron tres meses después de la primera inoculación, en la evaluación tres (realizada el 21 de abril). Estos fueron pérdida de coloración, de verde oscuro a verde-pálido, apariencia de deficiencia nutricional (clorosis) (Figura 3.19). Esto síntomas fueron similares para todos los hongos *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. roseum*, y *Verticillium*, a excepción de *Dematophora* sp. quien aparentemente no indujo síntomas en este mismo periodo de evaluación. Así mismo, el tratamiento testigo no indicio síntoma alguno de enfermedad (Figuras 3.20 a 3.23).

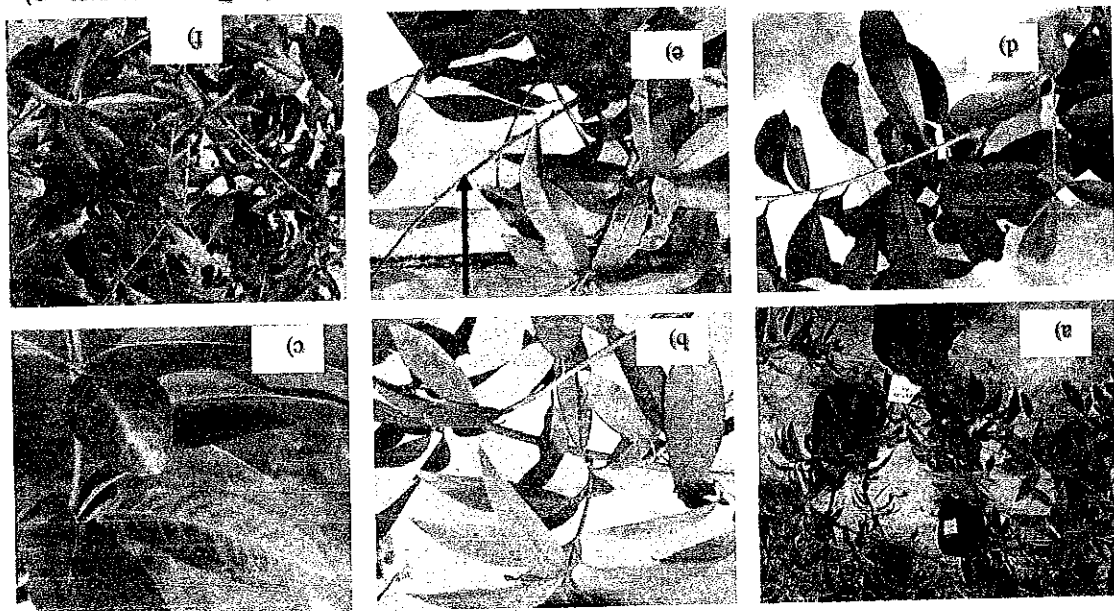


Figura 3.19. Síntomas iniciales en tratamientos con aislamientos de *F. oxysporum*. a) Testigo, b) Pérdida de color verde de pálido a amarillento, c) Clorosis con apariencia de deficiencia nutricional y resaltando las nervaduras de la hoja, d) Verde pálido, e) Muerte apical de tallos de ramitas con caída de hojas, y f) amarillamiento. Todo en comparación al testigo (a). Síntomas observados el 21 de abril de 2007 (tres meses después de la inoculación).

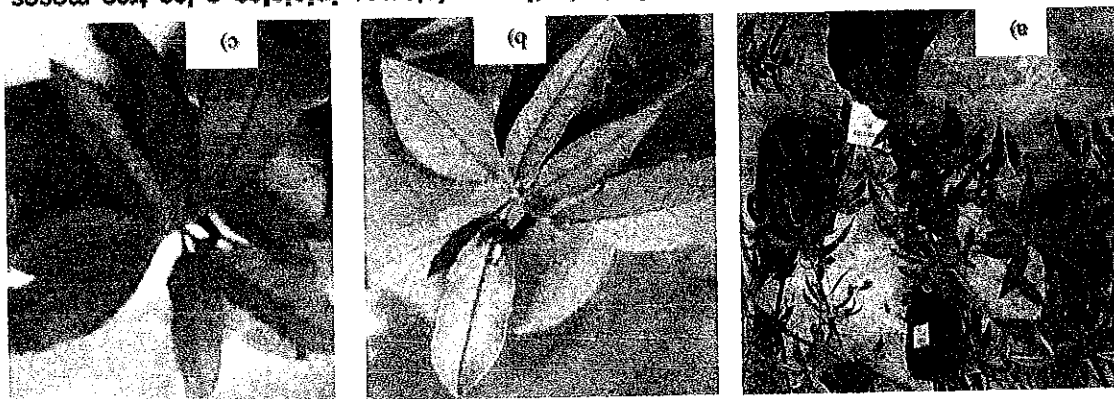


Figura 3.20. Comparación de tratamiento testigo y síntomas iniciales a los tres meses después de la inoculación con *F. solani*. a) Testigo, b) Testigo, c) Pérdida de coloración a verde pálido. Síntomas observados el 21 de abril de 2007 (tres meses después de la inoculación).

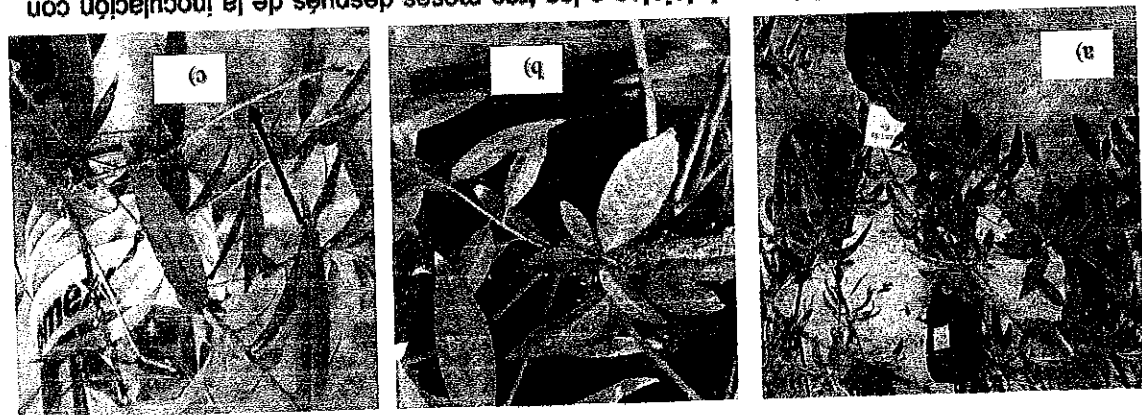


Figura 3.21. Testigo y síntomas iniciales a los tres meses después de la inoculación con *G. roseum*. a) Testigo, b) Clorosis con apariencia de deficiencia nutricional, c) Muerte de ramitas. Síntomas observados el 21 de abril de 2007 (tres meses después de la inoculación).



Figura 3.22. Testigo y síntomas iniciales a los tres meses después de la inoculación con *Verticillium albo-atrum*. a) Testigo, b) Inicio de clorosis, c) Amarillamiento. Síntomas observados el 21 de abril de 2007 (tres meses después de la inoculación).



Figura 3.23. Iniciales. Comparación del testigo y *Dematophora* sp. a) Testigo, b) Ag. Follaje sin síntomas.

b) Intermedios

Los síntomas clasificados en esta categoría fueron:

- a) gradual amarillamiento del follaje,
- b) decaimiento generalizado del árbol, y
- c) muerte regresiva de ramas (Figuras 3.24 a 3.27)

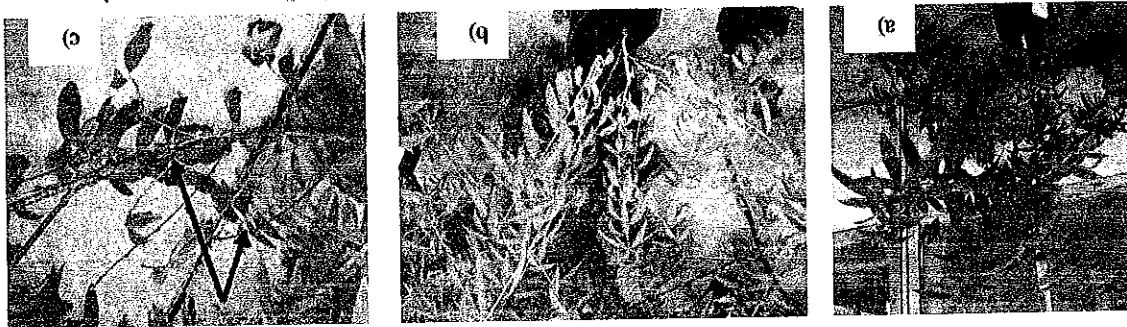


Figura 3.24. Síntomas intermedios, inducidos con aislamientos de *F. oxysporum*. a) Testigo, b) amarillamiento y decaimiento generalizado, c) muerte regresiva de ramas. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).

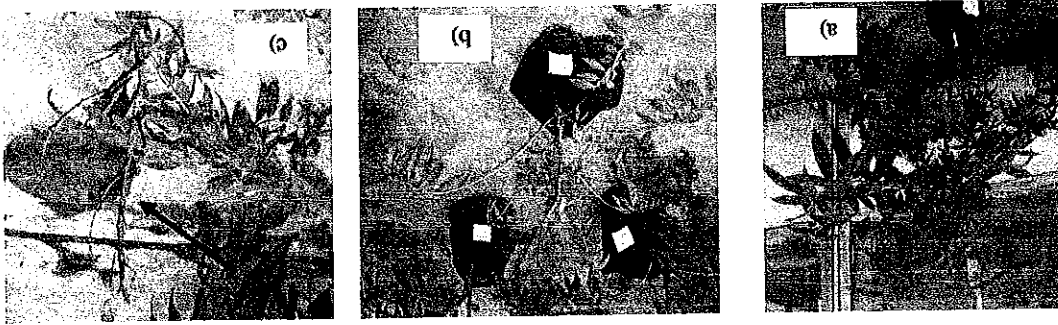


Figura 3.25. Síntomas intermedios, inducidos con el aislamiento de *F. solani*. a) Testigo, b) amarillamiento del follaje generalizado, c) muerte regresiva de ramas. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).



Figura 3.26. Síntomas intermedios, inducidos con aislamientos de *G. roseum*. a) Testigo, b) amarillamiento del follaje generalizado, c) muerte regresiva de la rama principal. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).



Figura 3.27. Síntomas intermedios, inducidos con aislamientos de *Verticillium albo-atrum*. a) Testigo, b) amarillamiento del follaje generalizado, y muerte regresiva de ramas. Síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).

Estos fueron similares para los tratamientos con *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. roseum*, y *Verticillium*. El amarillamiento del follaje y muerte regresiva de ramas fue también descrito por Suárez et al. (1999), y Aponte et al. (2001) para la enfermedad conocida como secazón y que fueron asociadas a los hongos *Fusarium* spp., *Phytophthora cinnamomi*, y *Pythium* sp., y así mismo por Rodríguez y Hernández (2004) como muerte regresiva de ramas.

Para *Dematophora* la pérdida de coloración de las hojas fue amarillo-pálido (casi blanco) (Figura 3.28), similar a lo descrito por Sinclair et al. (1987) y

Sztejnberg (1990) que señalaron la coloración de las hojas casi blancas y pequeñas para *Rosellinia necatrix* (*Dematophora necatrix*).

Además, a los seis meses después de la inoculación, se observó gomosis color ámbar en la base del tallo donde se realizó la herida para la inoculación III con discos de medio, pero sólo con los aislamientos de *F. oxysporum* y *G. roseum* (Figura 3.29). Al respecto Rodríguez y Hernández (2004) mencionaron también la presencia de gomosis asociada a *F. oxysporum* y *F. solani*, no se reporta para *G. roseum*.

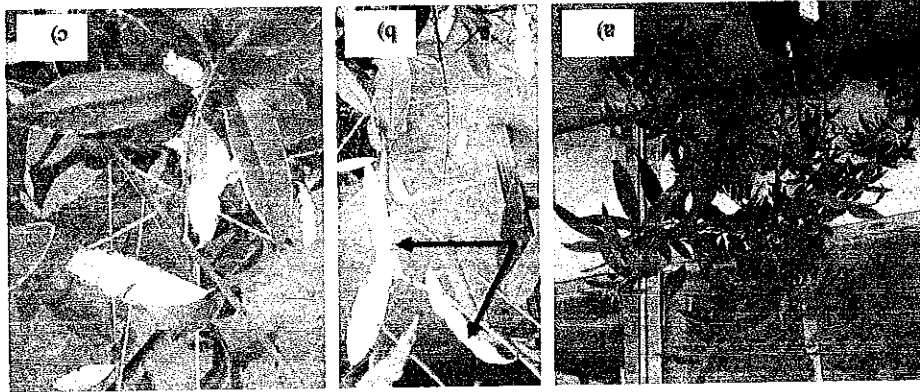


Figura 3.28. Sintomas intermedios, inducidos con aislamientos de *Dematophora* sp. a) Testigo, b) y c) Pérdida de coloración de amarillo pálido a casi blanco, no hubo muerte de ramas. Sintomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).

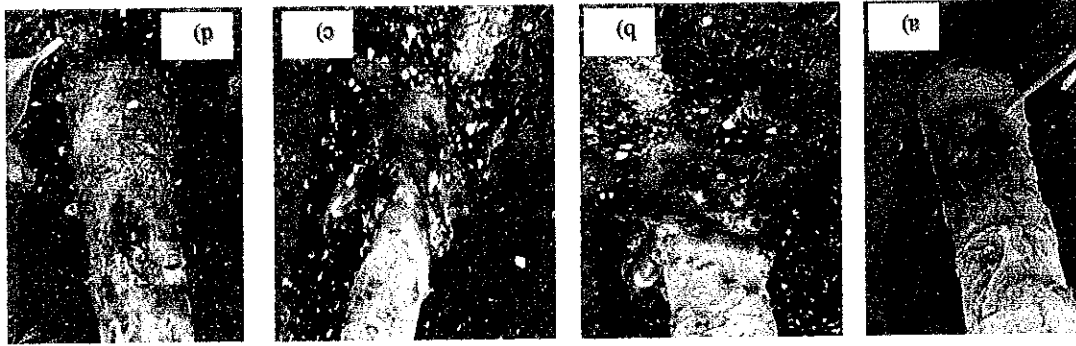


Figura 3.29. Presencia de gomosis de color ámbar en el tallo. a) Testigo, se observa la herida de inoculación seca, pero sin gomosis, b), c) Aislamientos de *F. oxysporum*, d) Aislamiento de *G. roseum*. Inoculados el 28 de marzo, síntomas observados el 21 de julio (seis meses después de la inoculación).

c) Avanzados

Los síntomas avanzados de la enfermedad, fueron inducidos por los aislamientos de *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. roseum* y *Verticillium albo-atrum* fueron:

- a) follaje amarillento,
- b) pérdida de turgencia,
- c) defoliación prematura,
- d) muerte descendente de ramas

La muerte descendente de ramas fue de la parte apical y las principales, e incluso el tallo principal; y fue más notorio para la parte correspondiente al injerto, ya que en chupones (ramas del porta injerto) se observaron aparentemente sanas en unos casos, y en otros también tuvieron afectación pero posterior a las ramas del injerto (Figuras 3.30 a 3.32).

Una diferencia en el amarillamiento del follaje se dio con el hongo *Verticillium albo-atrum* debido a que fue mas intenso el color amarillo y las hojas permanecieron adheridas al árbol (Figura 3.33), caso contrario en los hongos *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. roseum* que se defoliaron conforme se presentó el amarillamiento. La pérdida de turgencia antes observada fue señalada por Dzaguidze y Purtseladze (1979), quienes señalaron que fue causada por varias especies de *Fusarium*, entre ellas *F. oxysporum* y *F. solani*. Así mismo, otro sintoma encontrado en esta investigación fue reportada por Kanchaveili (1997) quien indicó que la muerte regresiva esta asociada con *G. roseum* y *Verticillium* sp.

En los árboles inoculados con el aislamiento de *Dematophora* se observó coloración amarillo pálido del follaje generalizado, de las hojas más viejas hacia la parte apical (Figura 3.34). No se observó la muerte descendente de ramas

como en los aislamientos anteriores, sólo muerte apical de algunas ramitas, similar a lo reportado por Szejnberg y Madar (1980), Sinclair *et al.* (1987) y Szejnberg (1990), aunque no específicamente en durazno, sino en frutales de hueso en general.

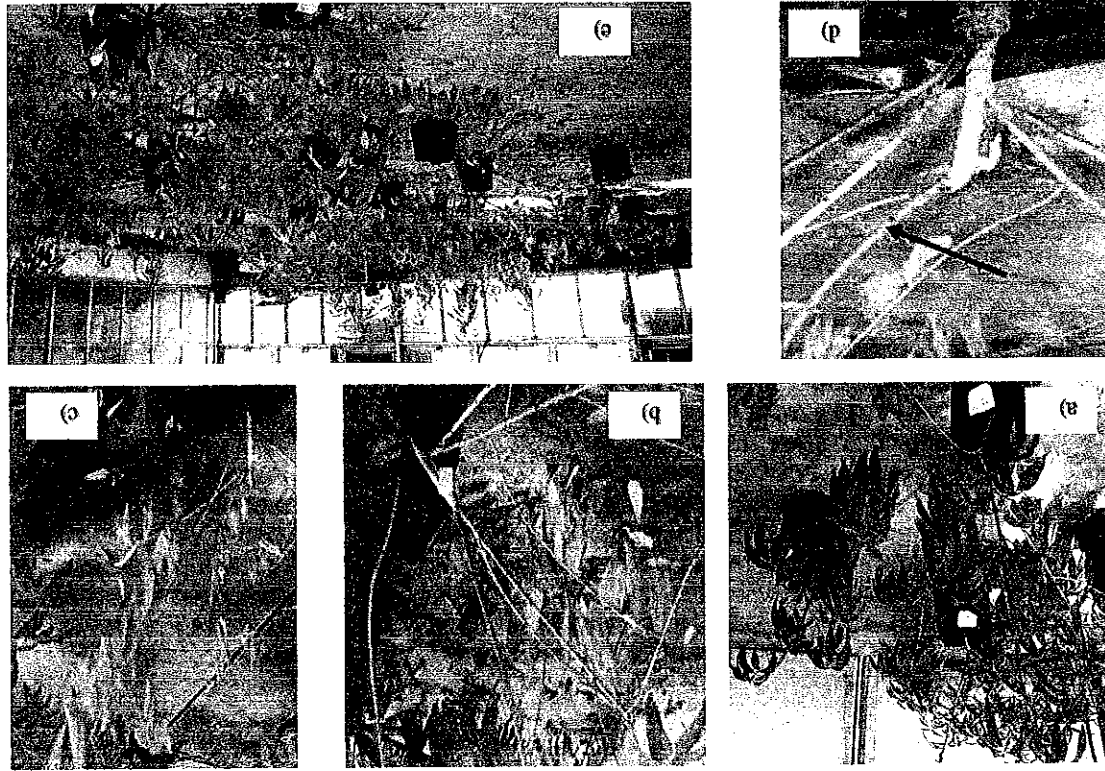


Figura 3.30. Síntomas avanzados. Ocasionados por el hongo *F. oxysporum*. a) Testigo sin inocular, b) amarillamiento generalizado, defoliación, c) pérdida de turgencia de las hojas, d) rama principal totalmente seca, e) panorámica de árboles con síntomas de amarillamiento, decaimiento y defoliación. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación)



Figura 3.31. Síntomas avanzados. Ocasionalmente por el hongo *F. solani*. a) Testigo sin inocular, b) La rama principal completamente seca pero el follaje del portainjerto aún verdes, c) El follaje de las ramas del portainjerto sin turgencia, d) Panorámica de árboles con síntoma de amarillamiento, pérdida de turgencia y defoliación, e) árbol muerto. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación)

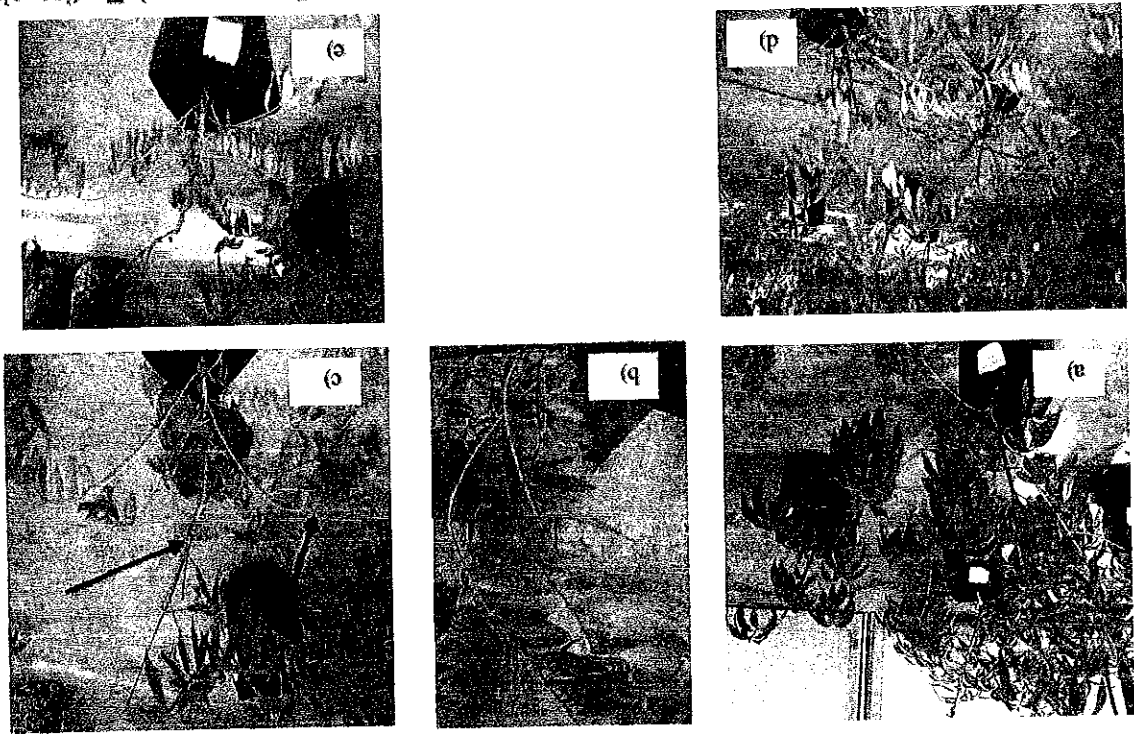


Figura 3.32. Síntomas avanzados. Ocasionalmente por el hongo *G. roseum*. a) Testigo sin inocular, b) Amarillamiento generalizado, c) Rama principal completamente muerta, con follaje amarillento pero aún verdes las ramas del portainjerto, d) Panorámica del amarillamiento generalizado, e) Arbol completamente muerto. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación)

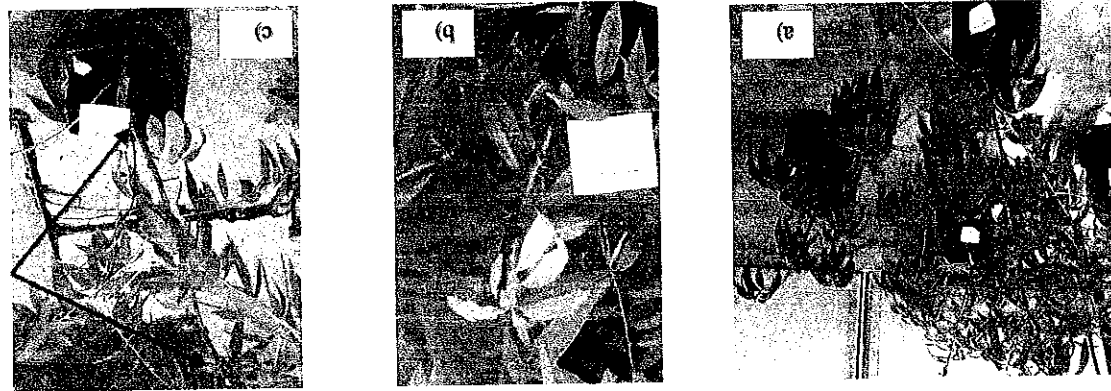


Figura 3.33. Comparación del tratamiento testigo con síntomas ocasionados por el hongo *Verticillium*. a) Testigo, b) árbol inoculado, con el follaje amarillo y adherido, c) la rama principal completamente muerta, las ramas del portainjerto aún verdes. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación)

3.3.5. Datos climatológicos

Para el experimento fue importante la temperatura y humedad del suelo (Cuadro 3.4). La temperatura fue la adecuada para el desarrollo de *F. oxysporum*, *F. solani* y *G. roseum* y *V. albo-atrum*, ya que Howell (1973) y Pérez (1990), reportaron como óptima de 21 a 27 y un promedio de 24 °C.

A. Dematophora, según Sivanesan y Holliday (1972) y Sinclair et al. (1987), le favorecen suelos con menor temperatura (22° C en promedio), por lo que probablemente esta variable influyó en la baja patogenicidad.

La humedad, aunque no se midió cuantitativamente se mantuvo constante a capacidad de campo ($\pm 60\%$), lo que se consideró un factor importante para el desarrollo de los hongos inoculados, que les favorece los suelos húmedos de acuerdo con los autores mencionados en los párrafos anteriores.



Figura 3.34. Comparación del tratamiento testigo con los síntomas avanzados y ocasionados por *D. necatrix*. a) Testigo, b) árbol inoculado, con el follaje amarillo pálido y leve defoliación, c) detalle de la coloración amarillo-pálido a casi blanco. Síntomas observados el 22 de octubre de 2007 (nueve meses después de la inoculación).

Cuadro 3.4. Condiciones de temperatura y humedad relativa promedio mensual durante la prueba de patogenicidad en invernadero.

Mes	Temperatura ambiental (°C)	Temperatura del suelo (°C)	Humedad relativa (%)
Febrero	21.9	21.6	32.9
Marzo	20.7	26.8	42.4
Abril	21.9	21.1	44.9
Mayo	21.8	20.5	50.2
Junio	21.4	22.2	50.4
Julio	21.0	19.9	59.2
Agosto	23.7	20.1	45.8
Septiembre	20.8	17.5	58.8
Octubre	21.8	18.3	59.4
Noviembre	24.6	17.7	59.6
Diciembre	21.2	17.2	61.4

Objetivo 2

3.3.6. Evaluaciones de raíz

Comparación del volumen de raíz

Fue notoria la diferencia en el volumen de raíz de los diferentes tratamientos en comparación con el testigo, debido al necrosamiento y reducción en el crecimiento de raíces, lo que fue visible al quitar el sustrato. El tratamiento que tuvo menor volumen fue el inoculado con el aislamiento 8DR2, correspondiente a *F. solani*, y el que tuvo menor afectación y por lo tanto mayor volumen de raíz correspondió a *D. necatrix*, pero aún así fue menor al registrado por el testigo. De los diferentes aislamientos de *F. oxysporum* el que tuvo menor volumen fue el 5BR1 y el menos afectado el 10ER2 (Cuadro 3.5) (Figura 3.35). La muerte de raíces está documentada para las especies de *Fusarium* spp., lo cual ha sido señalado por Suárez *et al.* (1999), Aponle *et al.* (2001), Nyczepir y Pusey

(1986), Namoradze (1975), Dzagnidze y Purtseladze (1979), quienes señalaron síntomas como pudrición seca y necrosamiento; mientras que para *D. necatrix* el síntoma característico reportado ha sido la pudrición de las raíces fibrosas (Szejnberg y Madar, 1980; Sinclair *et al.*, 1987; Szejnberg, 1990); necrosamiento de los haces vasculares por *Verticillium* spp según Pérez (1990) y Sotomayor (1997); y destrucción de tejidos de la corteza y necrosis por *G. roseum* (Tsakadze y Kanchavelli, 1979). Pero ninguno de los autores antes mencionados, reportaron sobre la afectación del volumen de raíz.

Cuadro 3.5. Afectación en el volumen de raíz en plantas inoculadas de 1.5 años de edad (cinco meses después de la inoculación).

Tratamiento	Volumen de suelo (cm ³)	Volumen de raíz (cm ³)	Volumen ocupado por las raíces (en %)
<i>F. oxysporum</i>	5,600	984.4	17.5
5BR1	5,600	1,111.5	19.8
6DR4	6,400	2,664.8	41.6
7DR1	5,600	4,480.0	80.0
10ER2	5,600	1,764.0	31.5
15AR2	6,400	3,591.0	56.1
16CR3	4,800	1,207.5	25.2
18DR4	5,600	2,340.0	41.8
21CR1	6,800	1,628.0	23.9
23DR1	6,400	697.5	10.8
<i>F. solani</i>	8DR2		
<i>G. roseum</i>	13DR2		
<i>Verticillium albo-atrum</i>	13R1		
<i>Dematophora</i> sp.	AgR1		
Testigo			

Figura 3.35. Sintoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con diferentes aislamientos de *F. oxysporum*. Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento 5B, c) 6D, d) 7D, e) 10E, f) 15A, g) 16C, h) 18D, i) 21C, y n) 23D (cinco meses después de la inoculación).

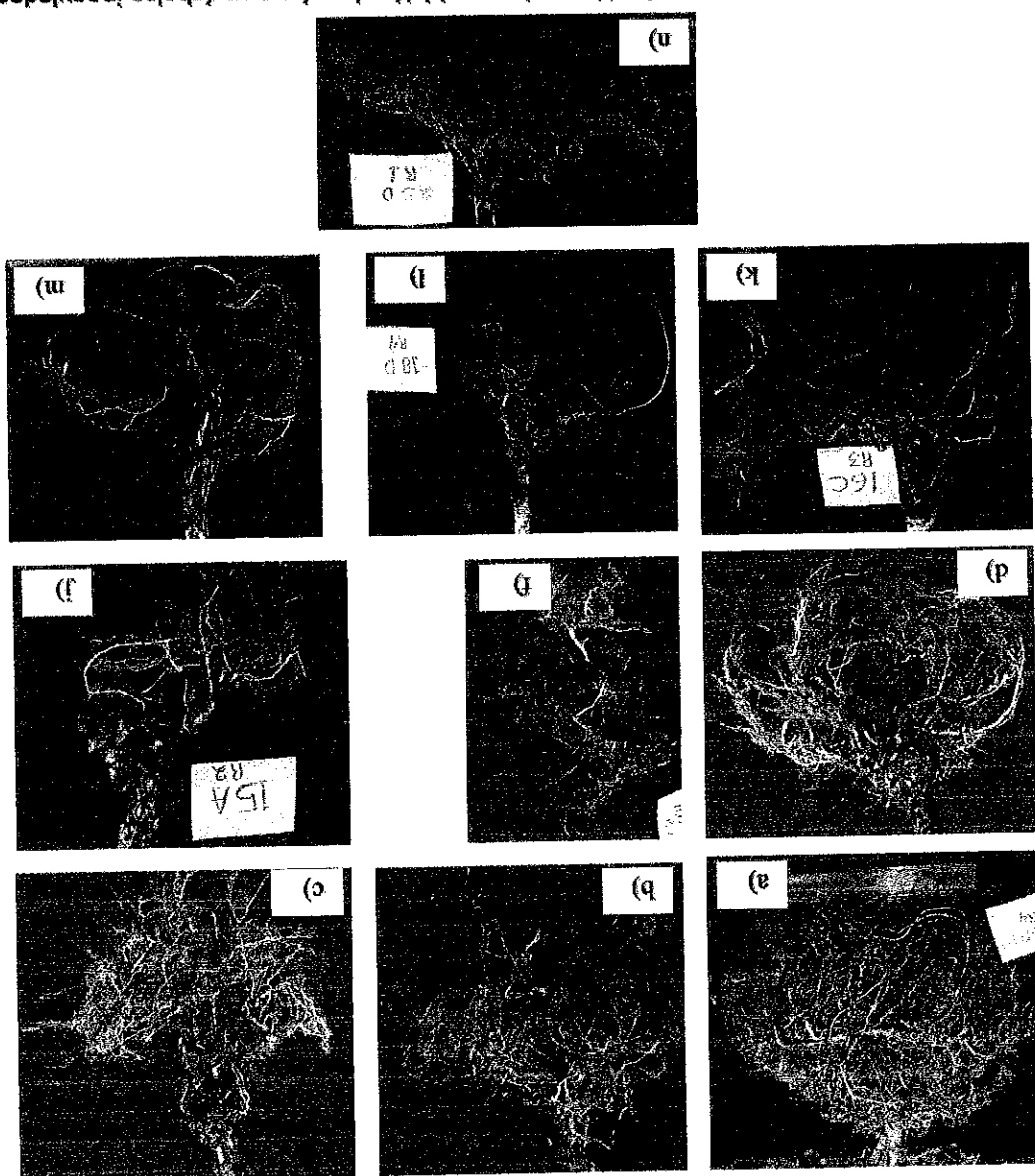


Figura 3.36. Sintoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con *F. solani*. Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento 8D (cinco meses después de la inoculación).

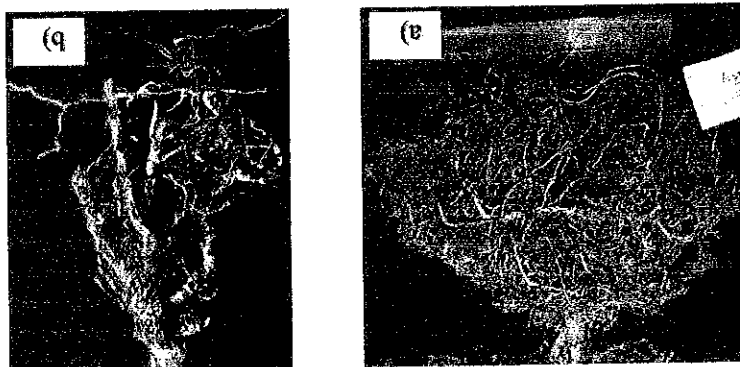


Figura 3.37. Sintoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con *G. roseum*. Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento 13D (cinco meses después de la inoculación).

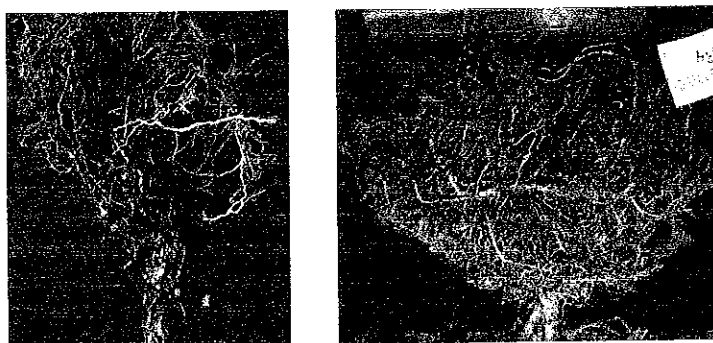
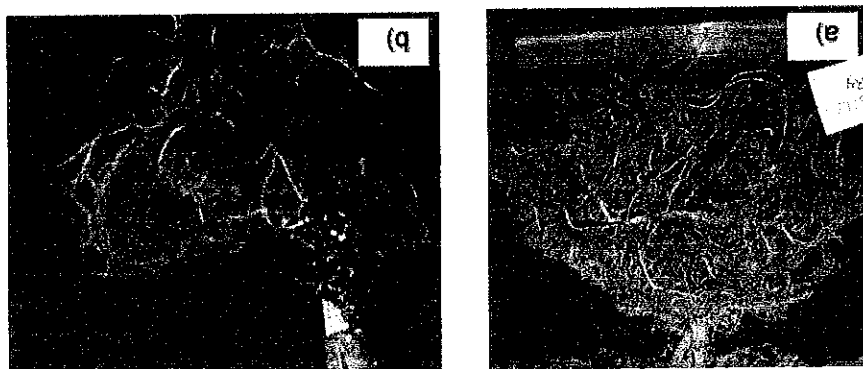


Figura 3.38. Sintoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con *V. albo-atrum*. Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento 13' (cinco meses después de la inoculación).



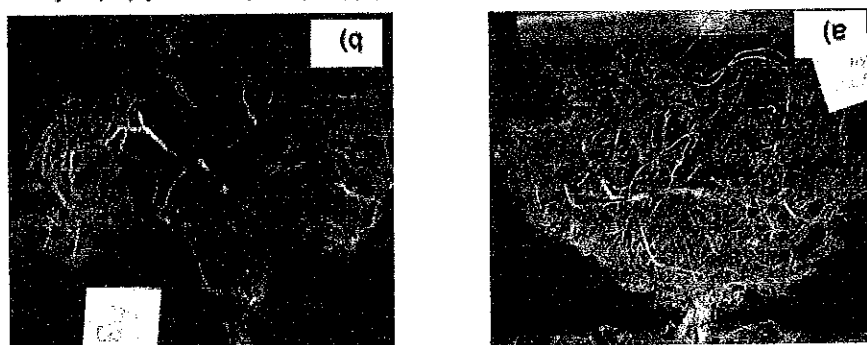
El aislamiento que causó mayor grado de necrosis en tallo, corona y raíz fue el 13DR2 correspondiente a *G. roseum*, seguido de 15AR2 de *F. oxysporum*. El aislamiento Ag de *D. necatrix* sólo en raicillas; no se observó en raíz principal, corona ni tallo (Cuadro 3.6). Estos síntomas de necrosis en haces vasculares concuerdan con los descritos por Hine (1961), Chandler et al. (1962), Hendrix y Powell (1970) Nyczepir y Pusey (1986), Suárez et al. (1999), Aponte et al. (2001), Rodríguez y Hernández (2004) asociados a *F. oxysporum* y *F. solani*, y por Pérez (1990) y Sotomayor (1997) para *Verticillium* sp. Las especies de

Para el caso de *Dematophora* sp. no se observó necrosis en haces vasculares, sólo en tejidos conductores de raicillas, y no fue notoria la reducción en el volumen total de raíces (Figura 3.46).

(Figuras 3.40 a 3.50).
Los síntomas de necrosis con coloración café rojizo, café claro y café oscuro en tejidos vasculares de raíz principal, secundaria, terciaria y raicillas; así como tallo basal (corona), principal y ramas fueron similares en los aislamientos correspondientes a *F. oxysporum*, *F. solani*, *G. roseum* y *Verticillium albo-atrum*, y aunque todos necrosaron el mismo tejido fue diferente el grado de afectación

Necrosis en tejidos conductores, y aislamientos fúngicos

Figura 3.39. Síntoma avanzado. Necrosis y pudrición de raíces en árboles inoculados con *Dematophora* sp. Se observa la diferencia en volumen y coloración. a) Testigo; b) aislamiento Ag (cinco meses después de la inoculación).



Fusarium spp., afectando durazno se habían reportado en varios países, pero no en México. Así mismo, la necrosis y obstrucción de vasos conductores en plántulas fue descrito por Tsakadze y Kanchavelli (1979), asociado a *G. roseum*. Sin embargo, no se había reportado en México.

Sintomas de necrosis en haces vasculares de duraznero fueron descritos por Ponce (1973), Pérez (1990), Sotomayor (1997), asociados a *Verticillium* spp. y en México, Elias *et al.* (2007) lo aisló e identificó (de duraznero) pero no se comprobó su patogenicidad.

La muerte de raíces fue similar a lo señalado por Szejnberg y Madar (1980), Sinclair *et al.* (1987) y Szejnberg, (1990), aunque no se observó la capa blanquecina de micelio entre la corteza, causado por *R. necatrix*. En México se reportó la presencia de este hongo por Elias *et al.* (2007), aislado de muestras de duraznero, aunque no se comprobó su patogenicidad.

Cuadro 3.6. Cuantificación de necrosis en cm en árboles de 1.5 años inculados con diferentes aislamientos (evaluados cinco meses después de la inoculación).

N e c r o s i s			
Tratamiento	Tallo	Corona	Raíz principal
<i>F. oxysporum</i>	1 x 0.7	-	7 x 0.4
5BR1			
6DR4	8.5 x 0.2	-	-
7DR1	15 x 0.1	-	6.5 x 0.1
8DR2	13 x 0.3	2 x 0.5	4.5 x 0.5
10ER2	12.5 x 0.5	-	13 x 0.2
15AR2	16 x 0.2	2 x 0.2	11 x 0.3
16CR3	7 x 0.5	-	-
18DR4	3.5 x 0.2	1.5 x 0.2	2 x 0.2
21CR1	7.5 x 0.2	-	2.5 x 0.2
23DR1	17.5 x 0.2	-	8 x 0.2
<i>G. roseum</i>	16.5 x 0.5	1 x 0.3	18 x 0.2
13DR2			
<i>V. albo-atrum</i>	14 x 0.6	-	12.5 x 0.3
13'			
<i>Dematophora</i> sp.	-	-	-
Ag			
Testigo	-	-	-

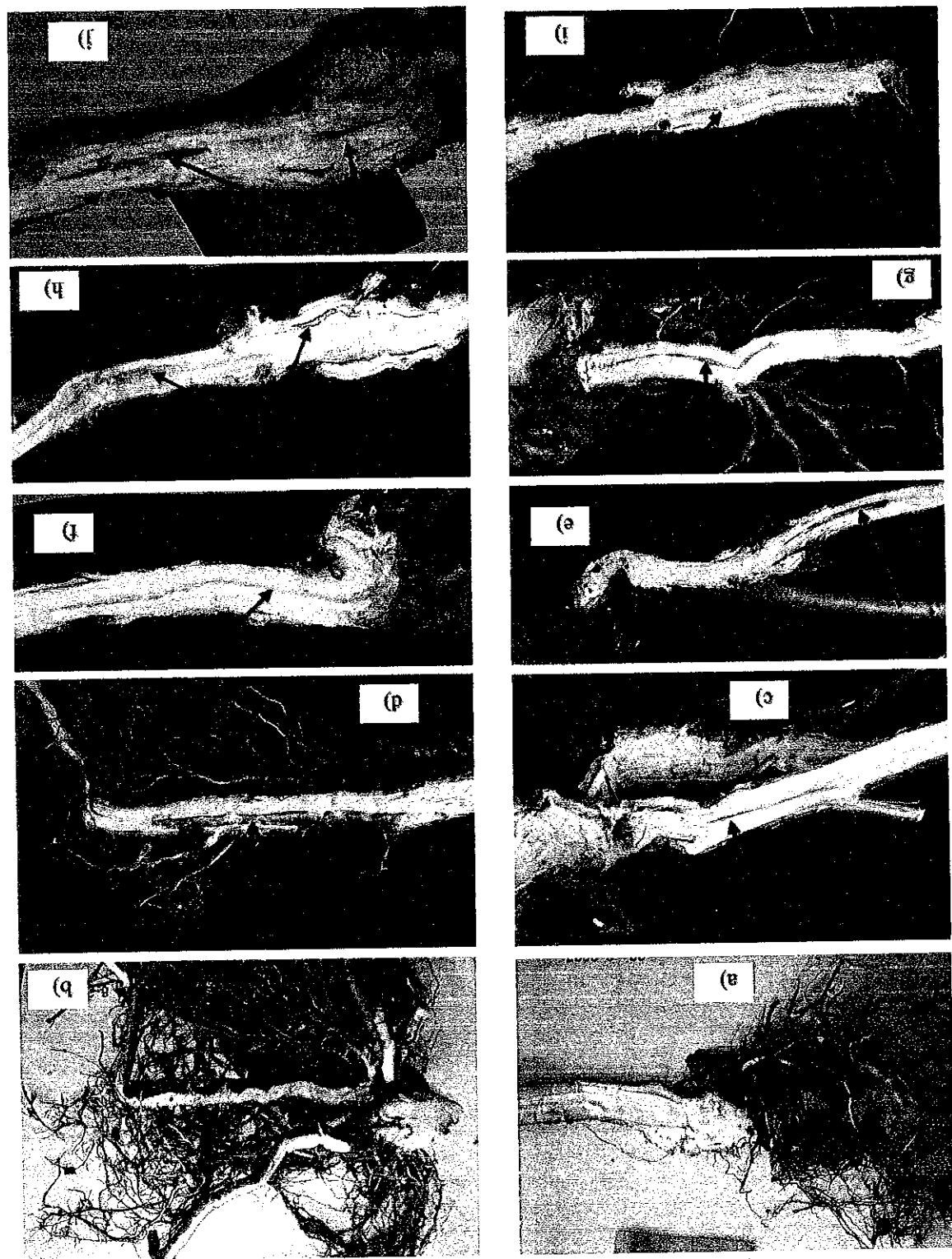


Figura 3.40. Necrosis café claro y oscuro en tallo, corona y raíz en árboles inoculados con cuatro aislamientos de *F. oxysporum*. Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. Aislamiento 5BR1: c) en tallo, d) en raíz principal. 6DR4: e) en tallo. 7DR1: f) en tallo, g) en raíz principal. 10ER2: h) en tallo, i) en raíz principal. 15AR2: j) en tallo (cinco meses después de la inoculación).

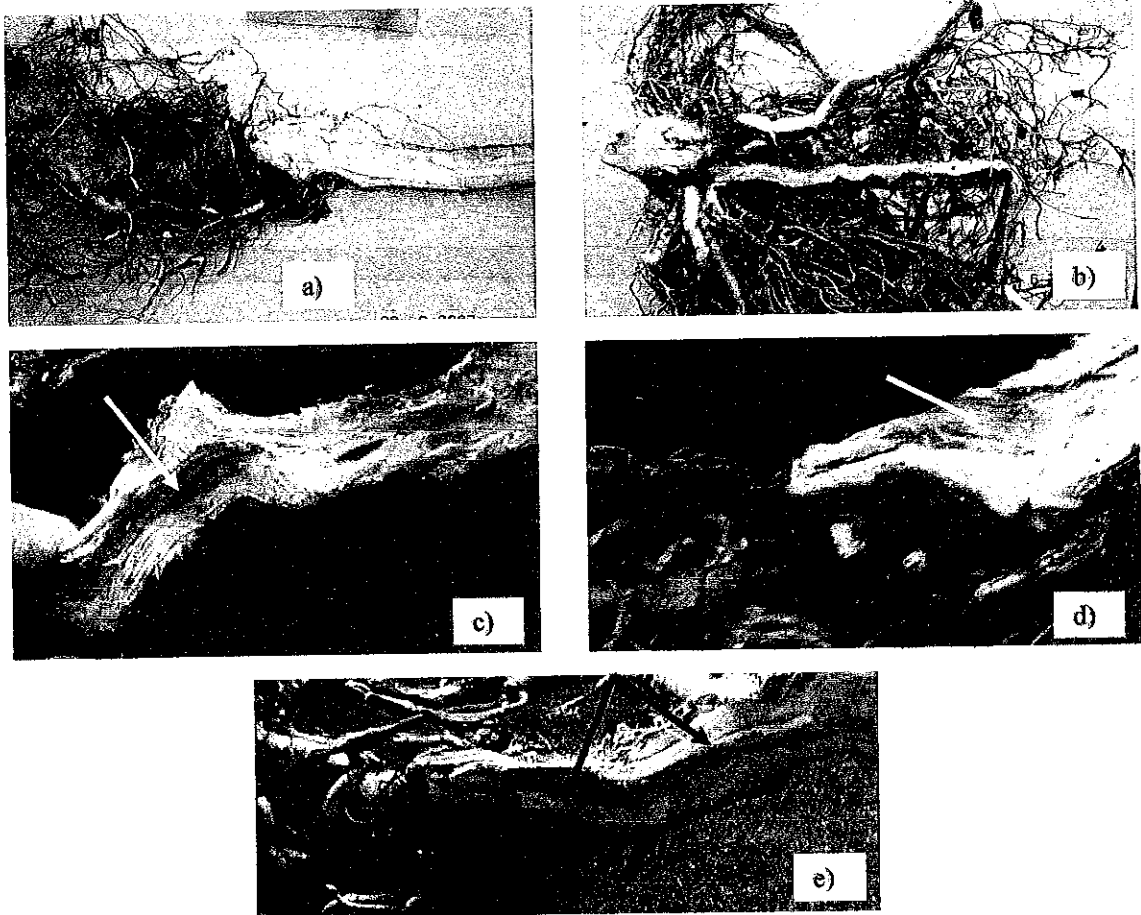


Figura 3.43. Necrosis en árboles inoculados con *F. solani* (aislamiento 8DR2). Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. c) En tallo, d) en corona, e) raíz principal (cinco meses después de la inoculación).

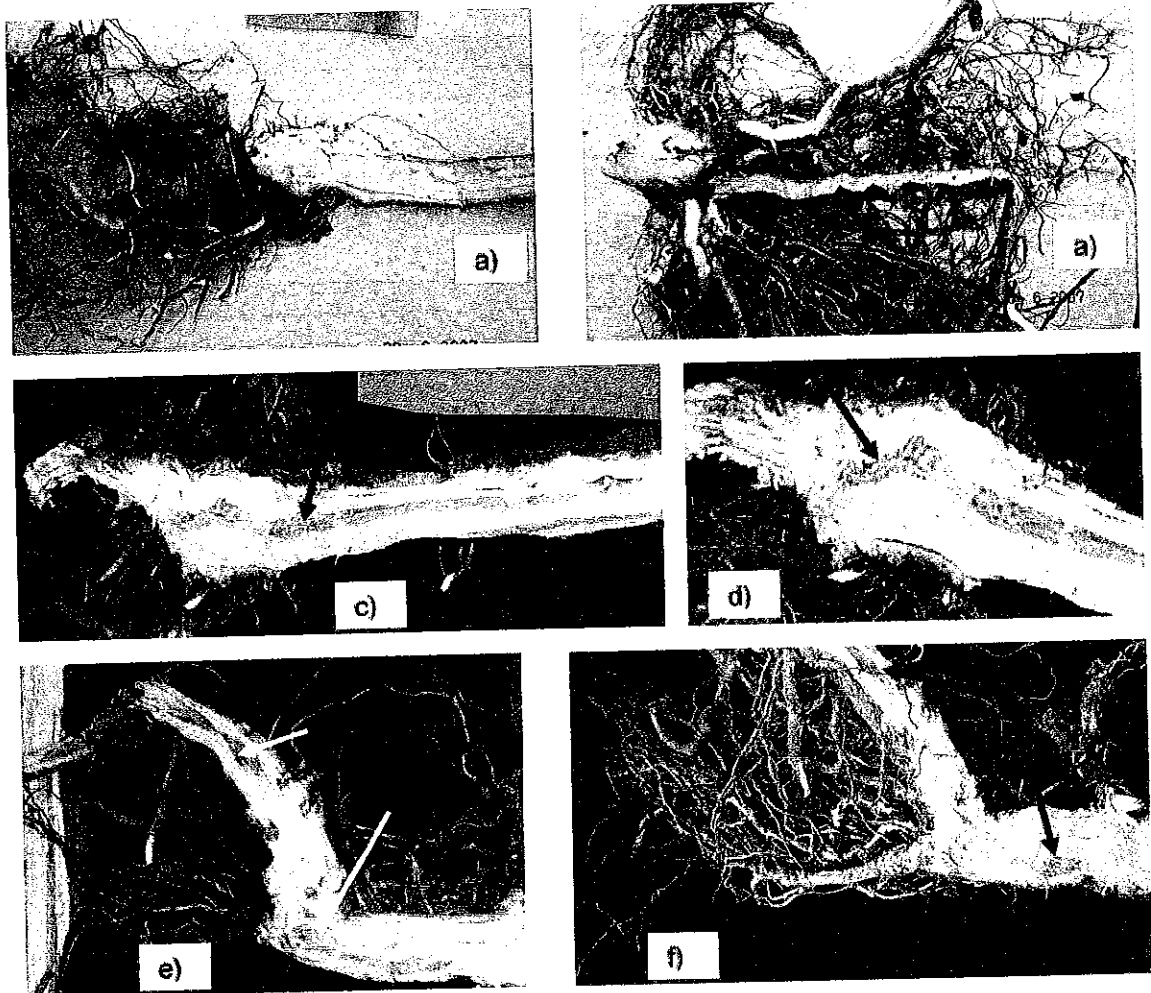


Figura 3.44. Necrosis en haces vasculares de árboles inoculados con *G. roseum*. Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. c) En tallo, d) en corona, e) en raíz principal, f) en raicillas (cinco meses después de la inoculación).

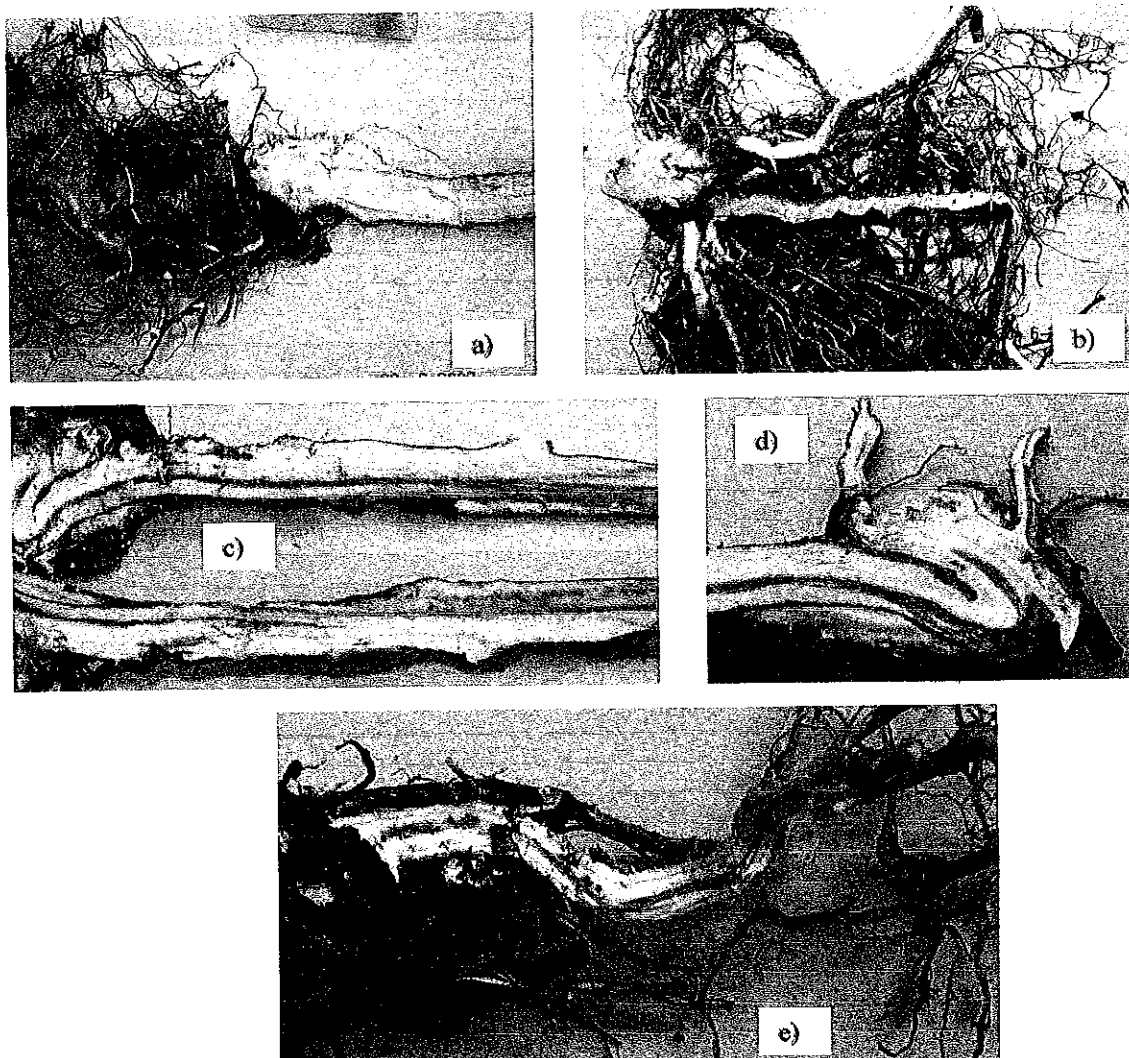


Figura 3.45. Necrosis de haces vasculares de árboles inoculados con *Verticillium albo-atrum*. Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. c) Coloración café rojiza en tallo, d) coloración café oscuro claro en corona, e) coloración café claro en raíz principal (cinco meses después de la inoculación).

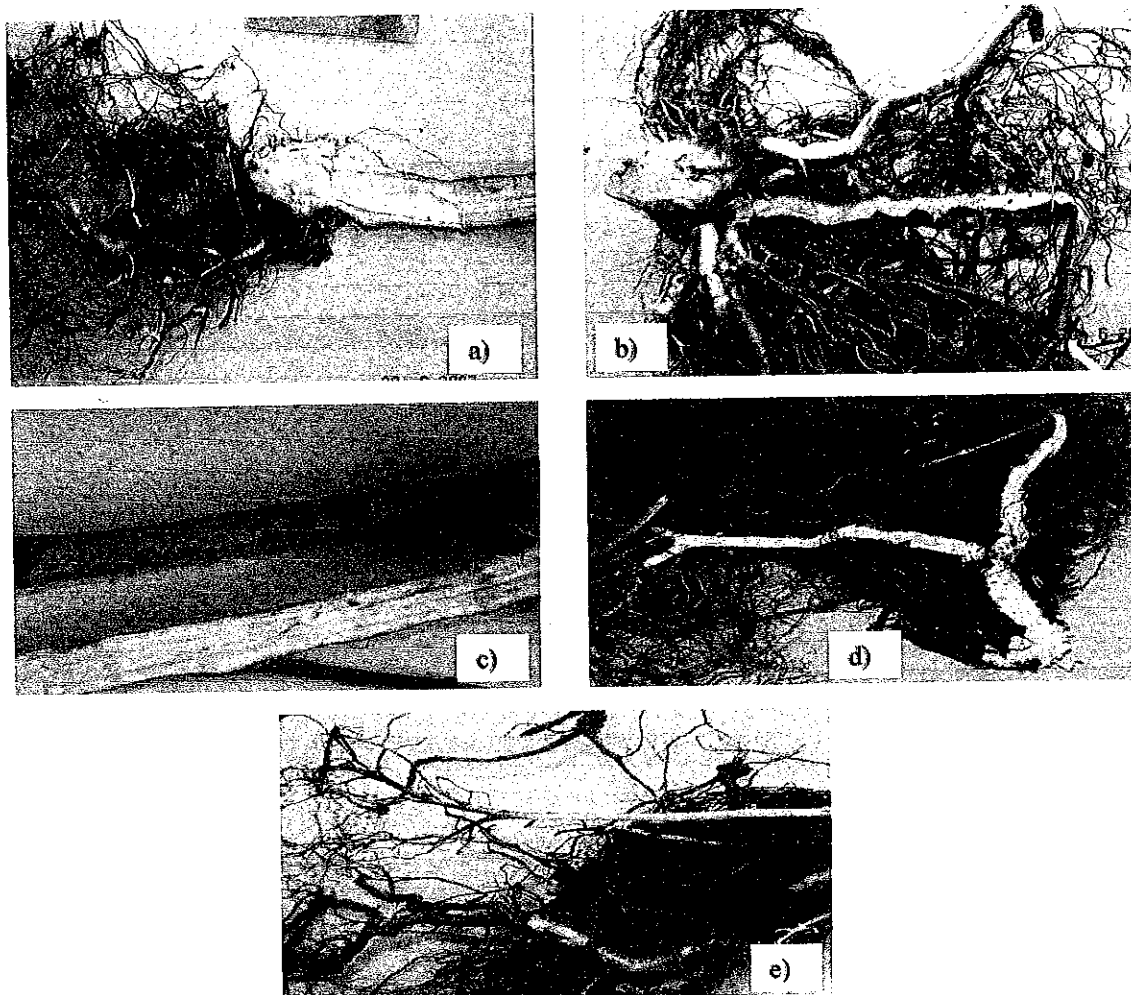


Figura 3.46. Síntomas en árboles inoculados con *Dematophora* sp. Testigo: a) Tallo y corona sin necrosis. b) Raíz principal sin necrosis. c) Tallo sin necrosis, d) raíz principal y corona, sin necrosis, e) necrosis de raicillas (cinco meses después de la inoculación).

Porcentaje de aislamiento

En todos los tratamientos se reaislaron los hongos inoculados, aunque no en 100 % de todas las muestras analizadas y con marcada necrosis como fueron de raicilla, raíz principal, corona, y tallo.

De los tratamientos con *F. oxysporum* el menor porcentaje de aislamientos fue de 20% (el otro 80% sin crecimiento fúngico o con algún contaminante como *Penicillium* sp.) y lo tuvo el aislamiento 23DR1 de la muestras de raicilla,

corona y tallo; el 100 % se obtuvo de muestras de raíz principal y corona de los tratamientos 18DR4 y 10ER2 respectivamente (Cuadro 3.7).

El tratamiento con *F. solani* se reaisló del 40 al 100%, de muestras de corona y raicilla; *G. roseum* se reaisló en 40% en cada una de las muestreas, excepto de tallo; *Verticillium* y *Dematophora* tuvieron un porcentaje bajo, de 20% en todas las muestras (el otro 80% sin crecimiento fúngico o con algún contaminante como *Penicillium* sp.) (Cuadro 3.7).

Considerando el total de muestras procesadas *F. oxysporum* se re-aisló en un 49.1 %, *F. solani* en 7.02, *Verticillium* y *Dematophora* en 3.5, y *G. roseum* en 5.3 % (Figura 3.43). El 35.08 % restante correspondió a muestras sin de hongos o bien de muestras con contaminantes: bacterias y *Penicillium* sp.

Cuadro 3.7. Porcentaje de re-aislamiento de plantas de durazno de 1.5 años después de cinco meses de inoculadas con 13 aislamientos fungosos por tres métodos de inoculación.

Fecha de siembra	Tratamiento	Muestra	Pigmentación de la colonia	Hongo Re-aislado	Porcentaje del aislamiento	Porcentaje de contaminantes o sin crecimiento fúngico
Hongo inoculado: 26/06/2007	<i>F. oxysporum</i> 5BR1	Raicilla	Café claro	Contaminante	60	40
		Raíz principal	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Corona	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	80	20
		Tallo	Púrpura algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
	6DR4	raicilla	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	60	40
			Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	40	60
		Raíz principal	Blanco a rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Corona	Rosa pálido, algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	80	20
	7DR1	Tallo	Verde olivo	Contaminante	20	80
		Raicilla	Verde olivo	Contaminante	60	40
		Raíz principal	Rojo ladrillo, inmerso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Corona	Rojo ladrillo, inmerso	<i>F. oxysporum</i>	40	60
	10ER2	Tallo	Blanco, verde en el centro	Contaminante	60	40
		Raicilla	Verde olivo	Contaminante	20	80
		Raíz principal	Verde olivo	Contaminante	20	80
		Corona	Rojo ladrillo, inmerso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
27/06/2007		Tallo	Rojo ladrillo, inmerso	<i>F. oxysporum</i>	20	80

28/06/2007	15AR2	Raicilla	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Raíz principal	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	20	80
		Corona	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Tallo	Blanco	<i>F. oxysporum</i>	20	80
	16CR3	Raicilla	Café claro	Contaminante	40	60
		Raíz principal	Blanco inmerso	<i>F. oxysporum</i>	20	80
		Corona	Crema, inmerso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Tallo	Sin crecimiento	-	-	-
	18DR4	Raicilla	Púrpura pálido	<i>F. oxysporum</i>	20	80
		Raíz principal	Púrpura algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
		Corona	Blanco a púrpura, algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Tallo	Púrpura, algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	20	80
29/06/2007	21CR1	Raicilla	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	40	60
		Raíz principal	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Corona	Púrpura, inmerso	<i>F. oxysporum</i>	40	60
		Tallo	Púrpura pálido, algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
	23DR1	Raicilla	Blanco a rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	20	80
		Raíz principal	Café claro	Contaminante	20	80
		Corona	Blanco	<i>F. oxysporum</i>	20	80
		Tallo	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	20	80
	Hongo inoculado: <i>F. solani</i>	Raíz principal	Blanco amarillento con margen naranja	<i>F. solani</i>	100	-
		Corona	Blanco amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>	80	20
		Tallo	Blanco amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>	40	60
		Tallo	Blanco amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>	80	20
28/06/2007	13DR2	Raíz principal	Blanco amarillento al reverso	<i>G. roseum</i>	40	60
		Corona	Blanco amarillento	<i>G. roseum</i>	40	60
		Tallo	Blanco amarillento	<i>G. roseum</i>	40	60
		Tallo	Sin crecimiento	-	-	-
	Hongo inoculado: <i>Verticillium albo-atrum</i>	Raíz principal	Blanco, flocoso	<i>Verticillium sp.</i>	20	80
		Corona	Blanco flocoso	<i>Verticillium sp.</i>	20	80
		Tallo	Blanco y verde olivo	Contaminante	60	40
		Tallo	Sin crecimiento	-	-	-
	Hongo inoculado: <i>Dematophora</i> sp. AgR1	Raíz principal	Blanco crema	<i>D. necatrix</i>	20	80
		Corona	Blanco crema	<i>D. necatrix</i>	20	80
		Tallo	Verde	Contaminante	20	80
		Tallo	Sin crecimiento	-	-	-
29/06/2007	Testigo	Raíz principal	Verde olivo	Contaminante	20	80
		Corona	Verde olivo	Contaminante	40	60
		Tallo	Blanco, margen verde	Contaminante	40	60
		Tallo	Sin crecimiento	-	-	-

3.3.7. Identificación morfológica

A nivel de género. Se identificaron los mismos hongos que se inocularon (*Fusarium* spp., *G. roseum*, *Verticillium* sp. y *Dematophora* sp., y con las características mencionadas en el Capítulo II, y los clasificados como contaminantes fueron en mayor porcentaje *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp.

A nivel de especie. Se identificaron las que se inocularon: *F. oxysporum*, *F. solani*, *Verticillium albo-atrum*, *G. roseum* y *Dematophora* sp., de acuerdo a lo descrito en el Capítulo II.

3.3.8. Identificación molecular

Se comprobó la identificación morfológica de los reaislamientos de: *F. oxysporum*, *F. solani*, *Verticillium albo-atrum*, *G. roseum* y *Dematophora* sp. de acuerdo a lo descrito en el Capítulo II. Los hongos re-aislados se volvieron a secuenciar y fue la misma secuencia.

3.4. CONCLUSIONES

- a. Los 13 aislamientos correspondientes a *F. oxysporum*, *F. solani*, *Verticillium albo-atrum*, *G. roseum*, y *Dematophora* sp. fueron los agentes causales de la pudrición de raíz, cuello, ramas, amarillamiento, marchitez y muerte de árboles de durazno.
- b. Los síntomas de clorosis y amarillamiento del follaje fueron visibles primero en las plantas inoculadas con el hongo *V. albo-atrum*.
- c. Los síntomas de clorosis, amarillamiento, defoliación, muerte de descendente de ramas y muerte de ramas fue similar para los hongos: *F. oxysporum*, *F. solani* y *G. roseum*.

- d. La diferencia en los síntomas causados por *V. albo-atrum* con respecto a los anteriores fue que no hubo caída de las hojas amarillas, y en *Dematophora* sp. el amarillamiento fue de tonalidad más baja, casi blancas.
- e. El aislamiento 6D de *F. oxysporum* fue el que indujo el porcentaje de incidencia mayor y el aislamiento 15A de *F. oxysporum* fue el que presentó el porcentaje de severidad mayor (porcentaje de infección).
- f. El aislamiento 18D de *F. oxysporum* fue el que mas afectó el ancho de copa de los árboles de durazno; *Dematophora* sp. fue el que más afectó el número de ramas totales, mientras que *G. roseum* fue el que indujo el mayor número de ramas muertas.
- g. El aislamiento 8D correspondiente a *F. solani* fue el que causó mayor afectación en el volumen de raíces.
- h. De los aislamientos de *F. oxysporum* el que causó mayor afectación fue el 18D.
- i. La muerte de árboles inició con los inoculados con *F. oxysporum*, en la evaluación 7, pero en la evaluación 10 todos los árboles estaban en fase terminal de la enfermedad.
- j. Después de la evaluación 10 ya no se siguió con el experimento porque todos los árboles estaban en fase terminal, sin aparente posibilidad de recuperación de los mismos.
- k. Las plantas no utilizadas en el reaislamiento de hongos inoculados se destruyeron y esterilizaron con Metam Sodio.

3.5. LITERATURA CITADA

- Aponte, A., A. Rondón, Z. Suárez, M. López, y R. Solórzano. 2001. Etiología y manejo integrado de la secazón o muerte repentina del duraznero en Aragua y Miranda. In: Memorias del XII Congreso.
- Chandler, W. A., H. Owen, and R. L. Livingston. 1962. Sudden decline of peach in Georgia. *Plant Disease Reporter*. 46 (2): 831-834.
- Dhingra, O. D., and J. B. Sinclair. 1987. Basic plant pathology methods. Fourth printing. CRC Press, Inc. USA. 355 pp.
- Dzagnidze, S. I., and Z. S. Purtseladze. 1979. Results of investigation of root rot of stone fruit seedlings in Georgia. *Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruzinskoi SSR* 30: 35-38.
- Elías, R. R., J. G. Reyes, y M. J. Aquino. 2007. Identificación y propuesta de manejo de enfermedades de raíz del durazno en el sur del Estado de México. Fundación Salvador Sánchez Colín. Coatepec Harinas, Edo. De México.
- Hendrix, F. F., and W. M. Powell. 1970. Control of root pathogens in peach decline sites. *Phytopathology*. 60: 16-19.
- Hine, R.B. 1961. The role of fungi in the peach replant problem. *Plant Disease Reporter*. 45 (6): 462-465.
- Howell, C. R. 1973. Pathogenicity and host-parasite relationship. *Proc. Work Conf. Nat. Conf. Pathol.* 19:42-46.

- Kanchaveli, Z. S. 1997. *Cylindrocarpon* dieback of fruit trees. *Zashchita i Karantin Rastenii* 10: 33.
- Namoradze, I. I. 1975. Effect of different temperatures on the growth and development of *Fusarium* species isolated from the roots of peach. *Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruz. SSR* 27: 153-157.
- Nyczepir, A. P., and P. L. Pusey. 1986. Association of *Criconebella xenoplax* and *Fusarium* spp. with root necrosis and growth of peach. *Journal of Nematology* 18: 217-220.
- Pérez, G. S. 1990. Manual para cultivar duraznero. Edit. Limusa. México. 108 p
- Ponce, F. 1973. Pudrición texana y otras enfermedades del durazno. *Memorias de la Mesa Redonda sobre la problemática actual del duraznero en Aguascalientes*. 1973. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 93 p
- Rodríguez, R. y E. Hernández. 2004. *Mucor* foliar spot and mycoflora in stem and root lesions of peach. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 88 (3-4): 155-160.
- Sinclair, W. A., H. H. Lyon, and W. T. Johnson. 1987. Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press. Japan. 574 p.
- Sivanesan, A. and P. Holliday. 1972. *Rosellinia necatrix*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. N° 352. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra.
- Sotomayor, S. C. 1997. El cultivo del duraznero. In: *Chile Agrícola* v. 22(229). Chile. pp: 386-389.

- Suárez, Z. C., A. Rosales, A. Aponte, A. Rondón, A. Bolívar y R. Crozzoli. 1999. Avances sobre la problemática fitopatológica del duraznero en el Municipio Tovar del estado Aragua. In: Memorias del XVI Congreso Venezolano de Fitopatología. Barquisimeto 14-18, noviembre. (Memorias, p 85).
- Sztejnberg, A., and Z. Madar. 1980. Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white root rot disease in fruit trees. Plant Dis. 64:662-664
- Sztejnberg, A. 1990. *Rosellinia (Dematophora)* root rot. In: Compendium of Apple and Pear Diseases. A. L. Jones y H. S. Aldwinckle (Eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN. pp: 46-47.
- Tsakadze, T., and S. Kanchaveli. 1979. *Gliocladium roseum* (Link.) Bain, the pathogen of withering of cherry. Trudy Nauchno-Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii Gruzinskoi SSR 30: 24-29.
- Wehunt, E. J., and D. J. Weaver. 1972. Effect of nematodes and *Fusarium oxysporum* on the growth of peach seedlings in the greenhouse. Journal of Nematology 4(4): 236

CAPITULO IV. AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE RAÍZ, CUELLO, RAMAS, AMARILLAMIENTO, MARCHITEZ Y MUERTE EN PLANTULAS DE DURAZNERO DE CINCO MESES DE EDAD

4.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo el objetivo fue demostrar los postulados de Koch a través de la patogenicidad de los hongos aislados de árboles enfermos y colectados en los municipios de Ocuilco y Tetela del Volcán, Morelos, pero en este apartado con plántulas de cinco meses de edad, bajo la hipótesis de que a menor edad de las plantas son más susceptibles a la enfermedad.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Preparación del material vegetal (marzo de 2007)

- a) Se utilizaron plántulas con cinco meses de edad, sin injertar, material criollo utilizado como patrón (Figura 4.1).
- b) Estas se produjeron comercialmente en un vivero del municipio de Tetela del Volcán, Morelos. Se compraron y transportaron a los invernaderos del departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo para su observación.
- c) Se mantuvieron en observación durante un mes en condiciones de invernadero ($25 \pm 5^\circ \text{C}$).



Figura 4.1. Plantas de 5 meses de edad antes del proceso de desinfestación.

Cambio de sustrato

- d) Se realizó con el material comercial Peat Most (Promix®) (Figura 4.2) en instalaciones de la Orientación Fitología del Colegio de Posgraduados.

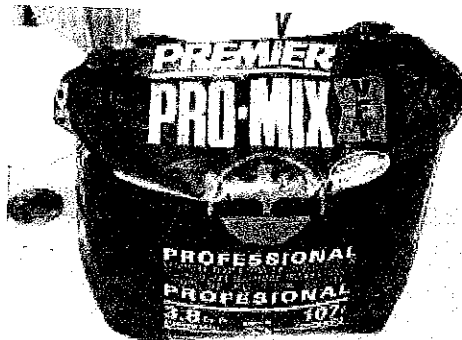


Figura 4.2. Sustrato comercial en las plantas de cinco meses de edad.

- e) El Peat most se colocó en bolsas de papel, se cerraron, y se esterilizó previamente en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.
- f) Se eliminó el sustrato original y se lavaron las raíces con agua corriente del grifo hasta quitar toda la tierra original adherida.

INOCULACION I

Se desinfestaron tres plantas por cada uno de los cinco aislamientos inoculados, y tres plantas testigo.

- g) Se sumergieron las raíces y parte del tallo en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % (Anexo 2.2) durante dos minutos. Esto fue para dos aislamientos de *Fusarium* spp. (15A y 6D) y uno de *Gliocladium* sp. (13D) (Figura 4.3).
- h) Para los aislamientos de *Verticillium albo-atrum* (13'), *Dematophora* sp. (Ag), y testigos, las plantas se sumergieron en una concentración de 10 % volumen-volumen (0.5%) de hipoclorito de sodio (Anexo 4.1).
- i) Se enjuagaron las raíces cinco veces con agua destilada esterilizada.

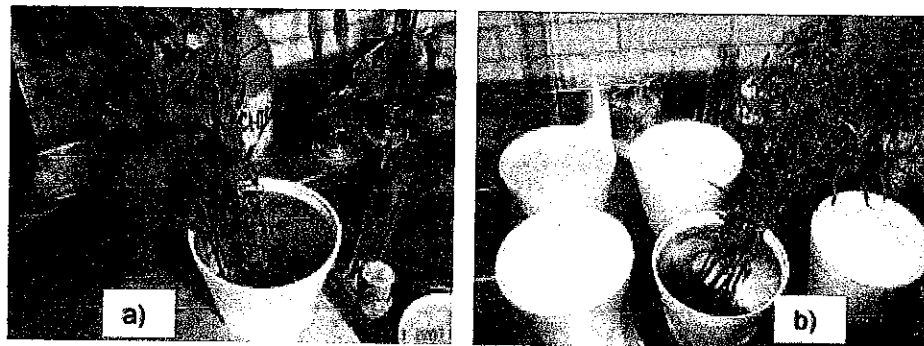


Figura 4.3. Desinfestación de raíces en hipoclorito de sodio. a) Sumergido en la solución desinfectante, b) lavado cinco veces con agua destilada esterilizada.

- j) Se colocó el nuevo sustrato, en vasos nuevos de unicel del número 760, con perforaciones de 0.3 cm de diámetro en el fondo.

Postulados de Koch

4.2.2. Inoculación (30 de marzo de 2007)

Se realizó el mismo día en que se cambió el sustrato para dos aislamientos de *Fusarium* spp. (15A y 6D) y *Gliocladium roseum* (13D). Los aislamientos

Verticillium albo-atrum (13') y *Dematophora* sp. (Ag) se inocularon al día siguiente de cambiar el sustrato.

- a) Las plántulas utilizadas contaban con 45 cm altura y 0.3 cm de diámetro del tallo principal. No se utilizó ningún diseño estadístico en este apartado, y se ocuparon tres repeticiones para cada aislamiento inoculado.
- b) **Heridas.** Estas se realizaron a las raíces cortando las puntas con tijeras esterilizadas, y fueron antes de agregar el nuevo sustrato.
- c) La solución conidial se ajustó a 6×10^6 , la cual se preparó en 600 mL.
- d) Antes de transplantar las plántulas se sumergieron durante cinco minutos a raíz desnuda con heridas en esta preparación conidial (Figura 4.4).
- e) Al depositar el sustrato se añadió 200 mL de suspensión conidial a cada maceta.



Figura 4.4. Inoculación de plantas de cinco meses, con heridas e inmersión a raíz desnuda. a) Desinfestación de raíces, b) sumergido en solución conidial.

INOCULACION II

- f) A las 24 h de la inoculación al suelo se hizo otra al tallo de las mismas plántulas.

- g) Para esto se utilizó un bisturí con el que se realizaron dos cortes longitudinales de 0.5 cm cada uno, opuestos en el tallo, únicamente sobre la corteza.
- h) Se colocó la mitad de un disco con medio EMA de 1 cm de diámetro y 10 y días de edad en cada incisión, de colonias de cada uno de los aislamientos.
- i) Se cubrió con algodón húmedo con agua destilada estéril.
- j) A manera de cámara húmeda se metió toda la planta en bolsa de plástico (Figura 4.5).

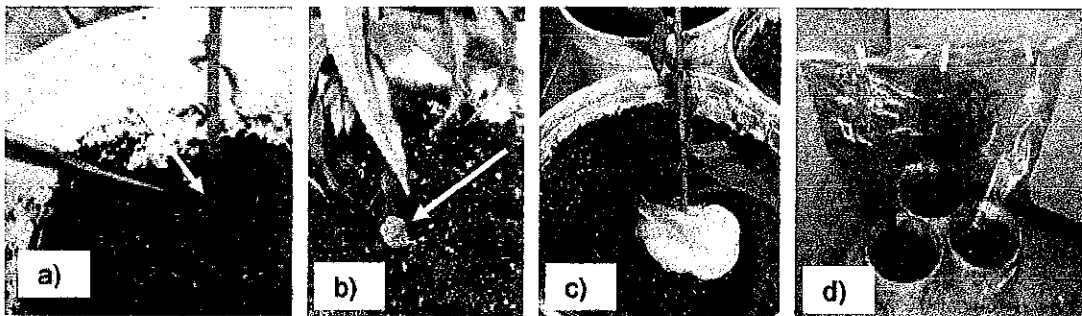


Figura 4.5. Inoculación al tallo: a) herida con bisturí, b) inóculo en discos de medio, c) se cubrió con algodón el inóculo, d) cámara húmeda.

- k) Después de la inoculación se mantuvieron las plántulas dentro de la cámara húmeda en condiciones ambientales de laboratorio.

Testigos

Los testigos fueron tratados con el mismo procedimiento, pero sólo se les aplicó una solución de los granos esterilizados, y en heridas del tallo el medio de cultivo para los discos fue sin ningún hongo.

En general el riego se realizó cada 48-72 horas según se requería para mantener la humedad constante a capacidad de campo.

Sin tratamiento

Estas plantas fueron tratadas con el mismo procedimiento de desinfestación que las inoculadas y testigos, pero no se les agregó granos esterilizados, ni se le realizaron al tallo, tampoco se les dio las condiciones de incubación. Se utilizaron en el procedimiento de reaislamiento.

4.2.3. Reaislamiento

El procedimiento de reaislamiento de patógenos se realizó a los 15 días después de la inoculación.

Se desechó todo el sustrato de la plántula sin dañar las raíces, y se lavó primeramente en agua corriente hasta eliminar todos los residuos de tierra. Se tomaron mediciones de lesiones en raíz y tallo, y para esto se abrió longitudinalmente la planta desde la raíz principal hasta el tallo.

Se hicieron cortes de tejido dañado de 0.3 cm de diámetro, clasificándolos por tallo sin corteza, sólo corteza y raíz, se desinfestaron en solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % durante un minuto y se enjuagaron cinco veces en agua destilada estéril. Se sembraron cinco trozos por planta y por tejido clasificado en medio de cultivo EMA. Las cajas se incubaron en condiciones normales de laboratorio.

A los 5 días después de inoculadas las plantas se llevaron al invernadero de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.2.4. Identificación morfológica y molecular

Se realizó como se describió en el Capítulo II, apartado 2.2.10, 11 y 12.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Preparación del material vegetal

Durante el tiempo que se observaron las plántulas en invernadero antes de la inoculación no mostraron síntomas de amarillamiento ni marchites.

El sustrato utilizado (Peat Most) favoreció la absorción y conservación de la humedad, condiciones favorables para los hongos inoculados (Howell, 1973; Sinclair *et al.*, 1987; Pérez, 1990).

4.3.2. Preparación del inóculo

Se obtuvieron resultados como se describió en el Capítulo III.

4.3.3. Inoculación

Inoculación I

No se supo si las concentraciones de hipoclorito de sodio causaron efectos de toxicidad en las plántulas, o si el trasplante afectó la fisiología de las plántulas. Esto en base a que se hicieron las inoculaciones inmediatamente después del trasplante al nuevo sustrato.

Inoculación II

Los primeros signos visibles como resultado de la inoculación fue la esporulación de los hongos en la herida en el tallo, a los cuatro días después de realizada la inoculación, favorecida por las condiciones de temperatura del laboratorio (20-25° C) [según Howell (1973) y Pérez (1990) quienes reportaron como óptima 24° C], además de la cámara húmeda y la humedad constante del sustrato, ya que la esporulación también se presentó sobre el sustrato (Figura

4.6). Estas condiciones climatológicas que favorecieron el desarrollo de los hongos fue también mencionada por Abdou *et al.* (1982), aunque en situaciones de campo, señalando una alta incidencia favorecida por la humedad del suelo. Esta sintomatología fue observada sólo en plantas inoculadas con aislamientos de *F. oxysporum* y *G. roseum* (Figuras 4.6 y 4.7)

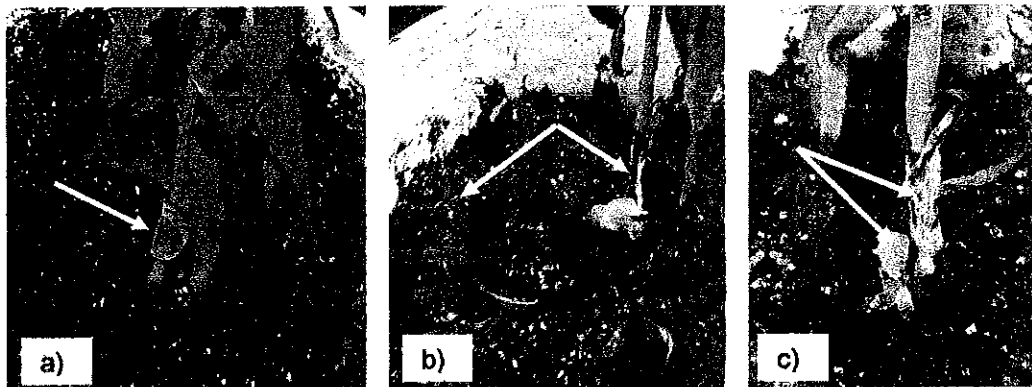


Figura 4.6. Esporulaci3n en la herida de inoculaci3n al tallo con aislamientos de *F. oxysporum*. a). Testigo con el disco de in3culo en la herida pero sin esporulaci3n f3ngica, b) esporulaci3n sobre el disco con in3culo y sobre el tallo, e incluso sobre el sustrato, c) esporulaci3n abundante sobre el tallo (cuatro d3a despu3s de la inoculaci3n).

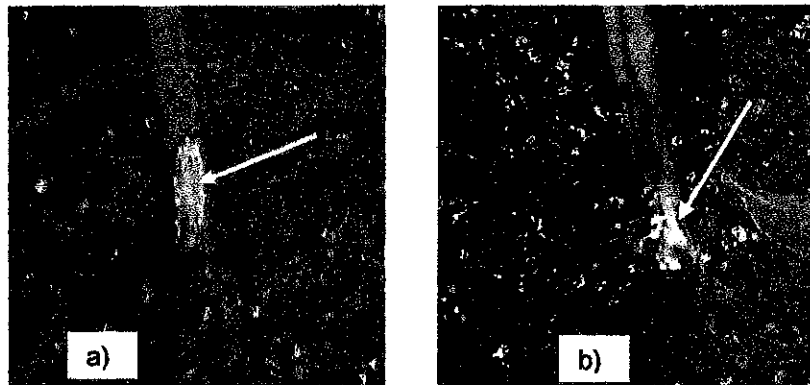


Figura 4.7. Esporulaci3n en la herida de inoculaci3n al tallo con *G. roseum*. a) el disco de medio no se observ3 pero s3 la esporulaci3n sobre el tallo, b) sobre el disco y el tallo (cuarto d3a despu3s de la inoculaci3n).

4.3.4. Síntomas en el follaje

En los tratamientos inoculados con aislamientos de *F. oxysporum* y *G. roseum* los síntomas fueron visibles ocho días después de la inoculación. Estos se manifestaron como pérdida de turgencia del follaje, marchitamiento, necrosamiento de la parte apical de las hojas y defoliación ligera (Figura 4.8). Con *V. albo-atrum* y *Dematophora* sp. sólo se observó pérdida de turgencia, sin necrosamiento y sin defoliación (Figura 4.9).

A los 15 días después de la inoculación con los aislamientos de *F. oxysporum* y *G. roseum* las plántulas se defoliaron y murieron completamente, con apariencia de necrosamiento en follaje, además de esporulación en la herida de inoculación realizada al tallo (Figura 4.10). Con *V. albo-atrum* las hojas no se necrosaron, se secaron aún verdes, sin llegar a amarillearse y quedaron adheridas al tallo, sin esporulación (Figura 4.11); con *Dematophora* sólo se observó la pérdida de turgencia, sin necrosis y también las hojas adheridas y sin esporulación (Figura 4.11).

Los síntomas observados anteriormente concuerdan con los descritos por Wehunt y Weaver (1972) para el hongo *F. oxysporum*, quienes lo reportaron en asociación con varias especies de nematodos como causantes de la afectación del crecimiento en plántulas de durazno en invernadero.

Asimismo Nyczepir y Pusey (1986) identificaron a dicho problema en asociación con *F. solani* y un género de nematodo, los cuales causaron necrosis en tejidos conductores y también afectación en el crecimiento en plantas de durazno, ambos casos en Estados Unidos. En Brasil, además de *F. oxysporum*, Corazza y Chilosí (1986) inocularon *Verticillium dahliae* y los reaislaron consistentemente de portainjertos de durazno afectados y con síntomas.

No se encontraron reportes en México para *Fusarium* spp., sólo para *Verticillium* sp. y *Dematophora* sp. pero aislados de muestras sintomáticas de árboles de durazno de huertos en producción, no en plántulas en invernadero (Elías *et al.*, 2007).

Aún cuando las plantas testigo también murieron posiblemente por el estrés del proceso de desinfestación, hubo diferencias en la rapidez con que se dio en las inoculadas y en el grado de afectación, por lo que se infirió que se debió a la diferencia de concentración del hongo como se describe después (Figuras 4.8 a 4.11).

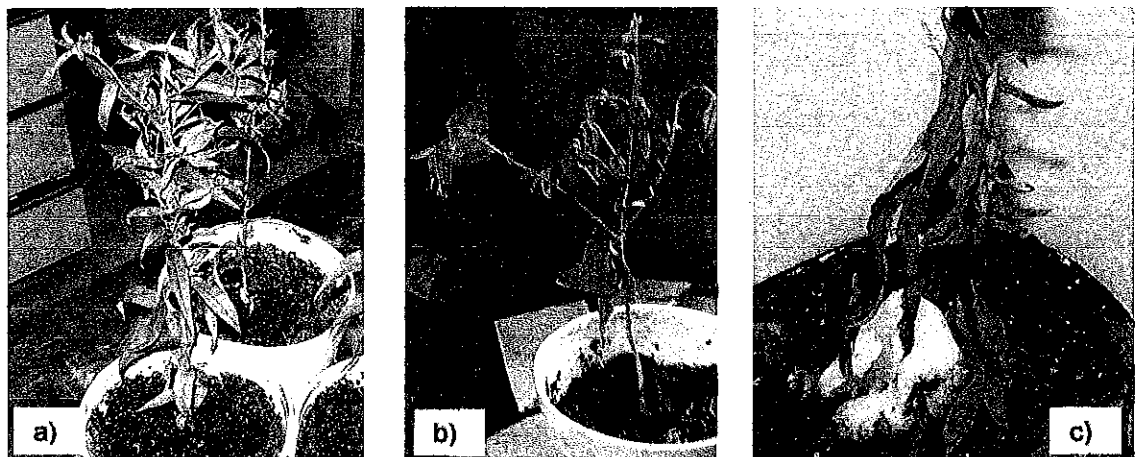


Figura 4.8. Síntomas observados en plántulas inoculadas con aislamientos de *F. oxysporum*. a) Testigo, b) pérdida de turgencia y defoliación, c) necrosis de la parte apical. Síntomas observados a los ocho días después de inoculadas.

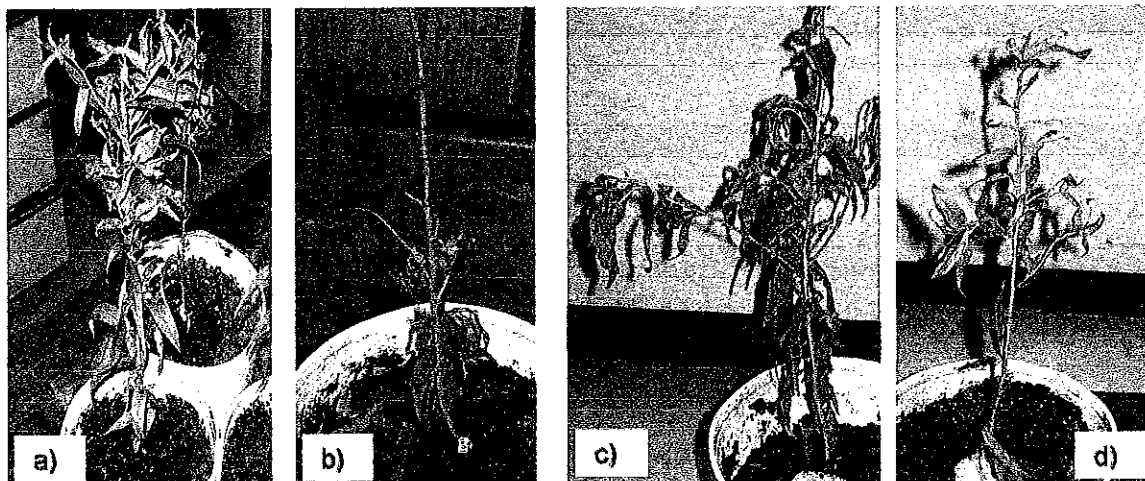


Figura 4.9. Síntomas observados en plántulas inoculadas con aislamientos de: a) Testigo, b) *G. roseum*, c) *V. albo-atrum*, d) *Dematophora* sp. Síntomas observados a los ocho días después de inoculadas.

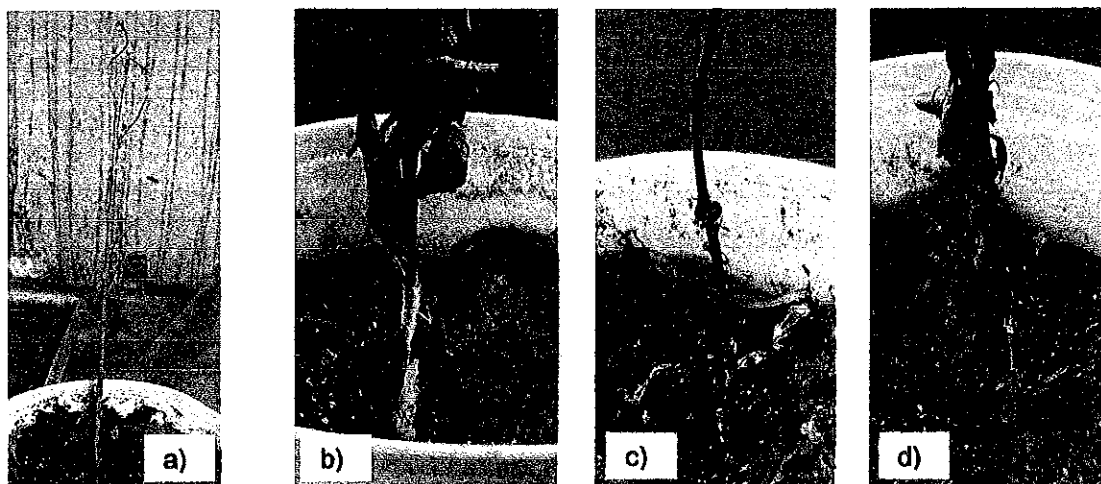


Figura 4.10. Síntomas observados a los 15 días después de la inoculación en plántulas inoculadas con aislamientos de: a) Testigo, b) *F. oxysporum* (aislamiento 15A), c) *F. oxysporum* (aislamiento 6D), d) *G. roseum*.

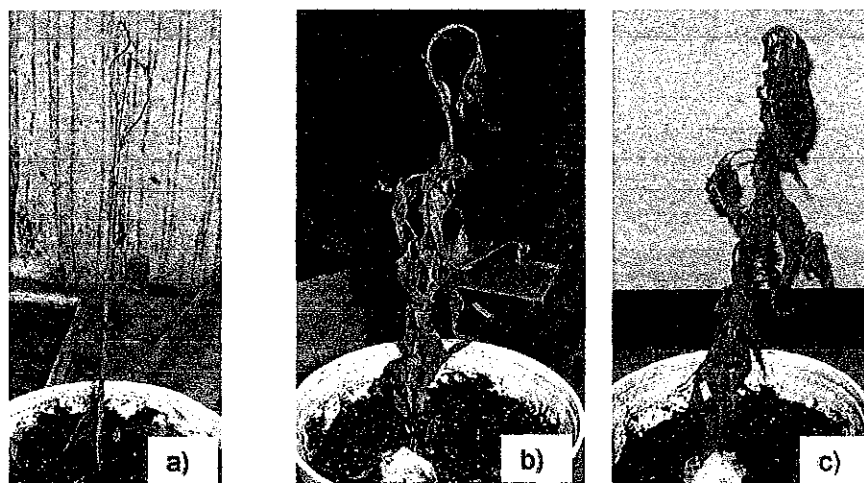


Figura 4.11. Síntomas observados a los 15 días en plántulas inoculadas con aislamientos de: a) Testigo, b) *V. albo-atrum*, c) *Dematophora* sp.

4.3.5. Reaislamiento

Necrosis en tallo y raíz

Se observó coloración café claro en haces vasculares de tallo. El daño abarco el área donde se realizó la herida de inoculación con discos de inóculo. El daño interno fue de uno a dos centímetros hacia arriba y hacia la base del punto de herida exterior por inoculación II.

Además en raíz principal al partirla longitudinalmente, también se observó la coloración café claro, e incluso café oscuro. Las raicillas sólo se necrosaron externamente, y la coloración fue normal al realizar cortes longitudinales (Figuras 4.12, 4.13 y 4.14). En todos los tratamientos inoculados se observó la sintomatología anterior. Esto fue incluyendo las plantas testigos y en plantas a las que no se les realizó ningún tratamiento (Figura 4.14), y sólo fueron diferentes ambas en las dimensiones de la necrosis en centímetros y el tiempo en manifestarse los síntomas.

Las plantas inoculadas mostraron mortandad por aplicación de mayor concentración de inóculo. Por otro lado las plantas testigo, y sin tratamiento, también tuvieron mortandad. Lo que tuvieron en común ambos tipos de plantas (inoculadas y testigo) fueron las mismas condiciones de incubación. Por ello se infirió que las plantas testigo fueron infectadas de manera natural en el vivero.

De los cinco aislamientos inoculados, las plantas inoculadas con uno de los aislamientos de *F. oxysporum* (6D) tuvo el mayor daño en tallo y raíz (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Cuantificación de necrosis en tallo y raíz de plántulas de cinco meses de edad y a los 15 después de inoculadas.

Repetición	Tratamiento	Hongo inoculado	Necrosis (cm)			
			Tallo	Raíz	Promedio	
					Tallo	Raíz
1	15A	<i>F. oxysporum</i>	2 x 0.2	2.5 x 0.1		
2	15A		2.0 x 0.2	2.5 x 0.1	1.6x0.2	2.5x0.1
3	15		1.0 x 0.2	2.5 x 0.1		
1	6D	<i>G. roseum</i>	3.0 x 0.2	14.5 x 0.1	2.8x0.1	10.3x0.1
2	6D		5.0 x 0.2	14 x 0.1		1
3	6D		1.0x 0.2	2.5 x 0.1		
1	13D		3.0 x 0.2	2.5 x 0.2		
2	13D		2.5 x 0.2	10.0 0.1	2.8x0.2	6.7x0.1
3	13D		3.0 x 0.2	7.5 x 0.1		
1	13'	<i>V. albo-atrum</i>	0	5.0 x 0.1		
2	13'		2.0 x 0.1	2.5 x 0.1	1.3x1.01	3.5x0.1
3	13'		2.0 x 0.1	3.0 x 0.1		
1	Ag	<i>Dematophora</i> sp.	2.0 x 0.2	4.5 x 0.2		
2	Ag		2.5 x 0.2	3.0 x 0.2	2.5x0.2	2.5x0.2
3	Ag		3.0 x 0.2	0		
1	Testigo	Sin inocular	0	3.0 x 0.2		
2	Testigo		2.0 x 0.2	0	0.6x0.06	2x0.1

3	Testigo	0	3.0x 0.1		
1	Sin	2.5 x 0.2	5.5 x 0.1		
	tratamiento*			2.5x0.2	6.3x0.1
2	Sin	2.0 x 0.2	6.5 x 0.1		
	tratamiento*				
3	Sin	3.0 x 0.2	7.0 x 0.1		
	tratamiento*				

*Plantas remanentes observadas.

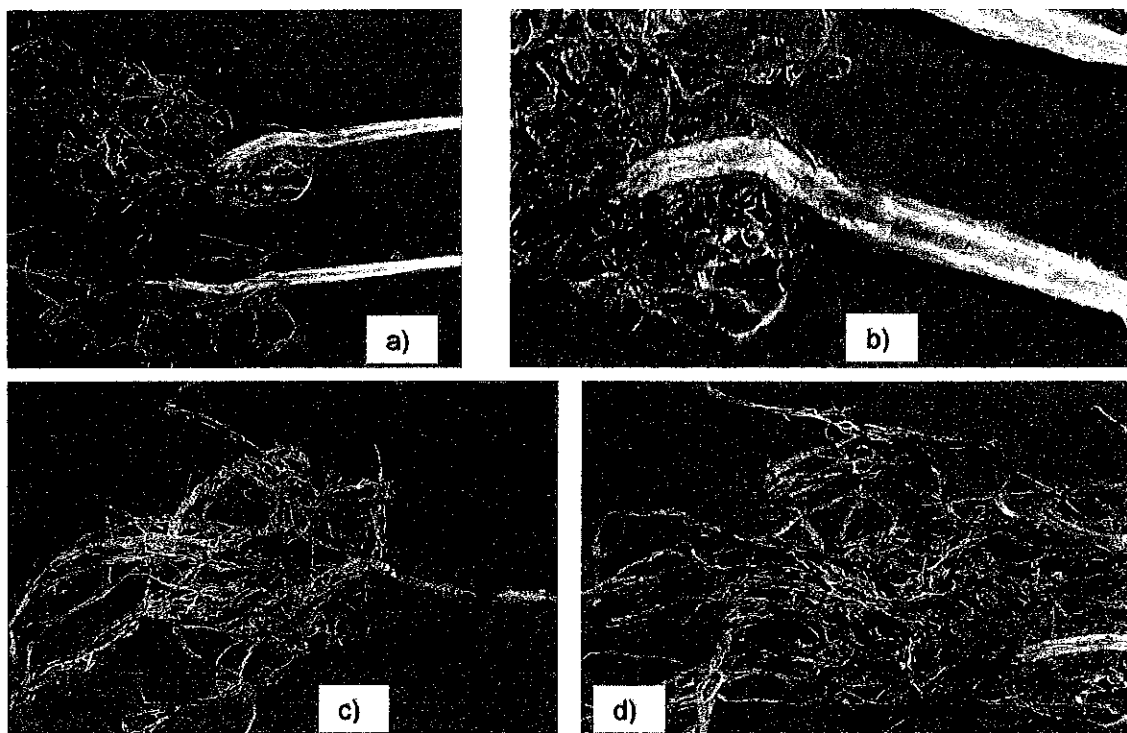


Figura. 4.12. Necrosis en plántulas inoculados con el aislamiento 15A y 6D de *F. oxysporum*. a) en tallo y raíz principal, b) en tallo, c) superficialmente en raicillas y la base del tallo) las raicillas, d) en raicillas, se observa unas mas oscuras que otras (15 días después de la inoculación).

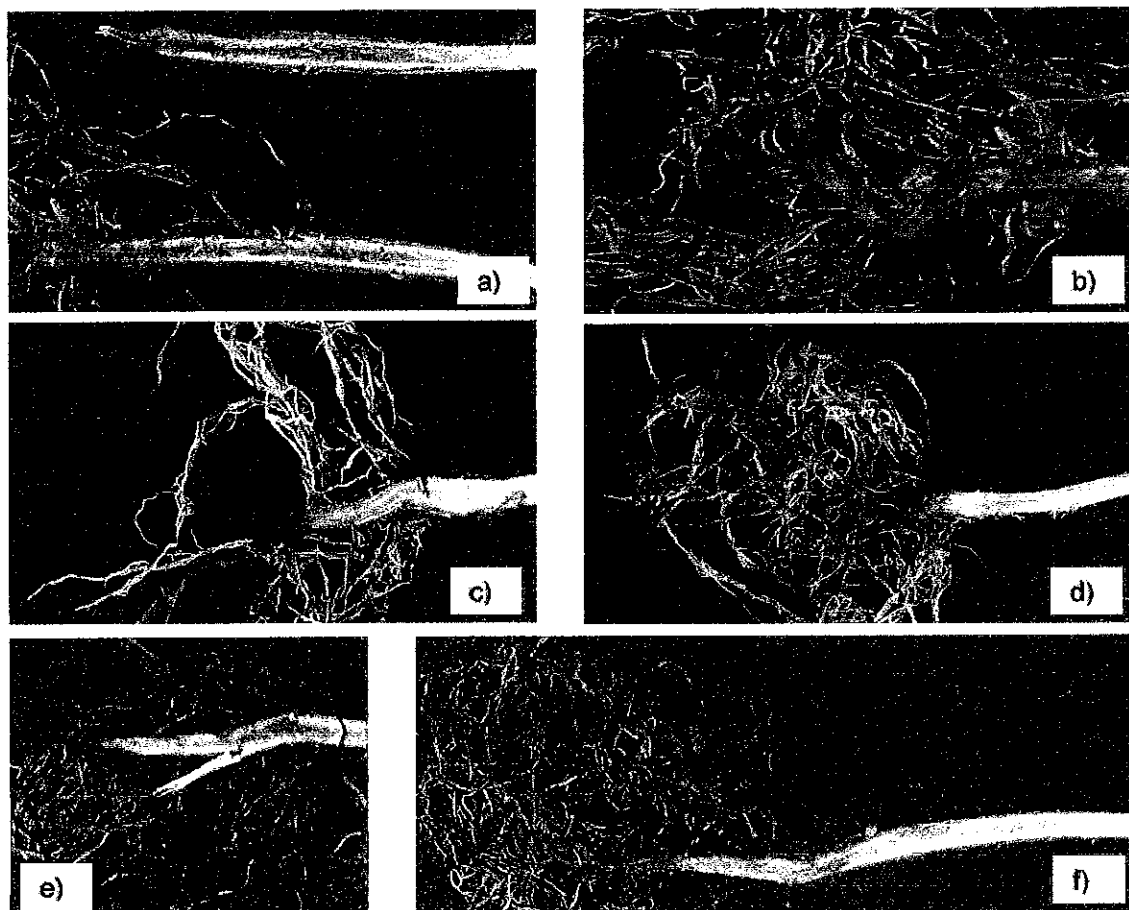


Figura 4.13. Necrosis en tallo, raíz principal, y raicillas en plántulas inoculadas con diferentes aislamientos. *G. roseum*: a) en tallo, b) en raíz principal; *V. albo-atrum*: c) raíz principal, d) en raicillas; *Dematophora* sp.: e) raíz principal, f) tallo y raicillas (15 días después de la inoculación).

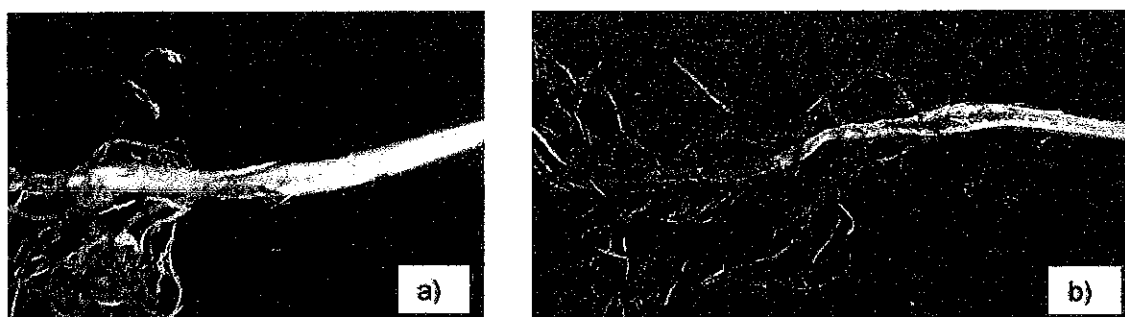


Figura 4.14. Necrosis en tallo, raíz principal y raicillas en plantas sin inocular: a) Tratamiento testigo, b) sin tratamiento (plantas remanentes observadas).

Porcentaje de re-aislamientos

En todos los tratamientos y de las dos formas de inoculación se reaislaron los cinco aislamientos de los hongos inoculados, aunque algunas colonias se pigmentaron las colonias diferente a la original. Estas se identificaron como la mismas especies inoculadas: *F. oxysporum*, *G. roseum*, *V. albo-atrum*, y *Dematophora* sp.

De plantas testigo, y plantas sin ningún tratamiento se aisló *F. oxysporum* y *F. solani*. De esto se infirió que tales plantas ya venían infestadas con estos hongos desde el vivero donde se produjeron, aunque no mostraron síntomas en el periodo de observación en invernadero y proceso de tratamiento, y sólo fue evidente hasta darles las condiciones de incubación propicias para que se manifestara la enfermedad, y al realizar los cortes para observar los tejidos conductores infestados (Figura 4.14).

En el vivero donde fueron producidas tales plantas, es posible que todas las usadas en los diferentes tratamientos estuvieran en la misma condición de infección que se manifestó durante la incubación. Por otro lado, sí se comprobó la patogenicidad de las especies inoculadas por los síntomas de marchites, defoliación y muerte al igual que las no inoculadas, aunque con diferencia en el grado de afectación. A los ocho días después de la inoculación, las inoculadas mostraron pérdida de turgencia y las testigos aún no, a los 15 días se dio la muerte de todas las plantas incluyendo testigos, pero la diferencia fue que estos últimos mantuvieron el color verde y turgente del tallo, y en las otras fue tallo seco (marchito).

Estos resultados indicaron que lo observado en los huertos es consecuencia de las inapropiadas condiciones en que se produce el material propagativo en los viveros, además de que es posible que las áreas de cultivo (suelo) ya estuvieran infestadas, según lo manifestaron los productores porque al

reemplazar los árboles muertos por otros sanos estos también se enfermaron y murieron.

Aunque no fue el objetivo de este trabajo, fueron evidentes estas circunstancias tales como: las semillas y varetas utilizadas no proceden de huertas madre con el manejo fitosanitario ni las mejores características genotípicas adecuadas. El sustrato utilizado es una mezcla de suelo y hojarasca del bosque sin desinfestar. Esto último particularmente es una posibilidad de introducir diferentes microorganismos que habitan en el bosque de encino-pino de manera natural, entre ellos las especies de hongos patógenos al cultivo del duraznero. Es por esto que los arbolitos plantados, en su primer o segundo año de producción en campo inician los síntomas de amarillamiento.

De plántulas inoculadas se reaisló en mayor porcentaje a *F. oxysporum*, en 100% de las muestras de dichas plantas, seguido de *G. roseum* que aunque tuvo porcentajes bajos en unas muestras, también se reaisló en 100% en otras; y el más bajo fue para *V. albo-atrum* y *Dematophora*, con el 20%. De las plantas testigo y sin tratamiento se aisló a *F. oxysporum* y a *F. solani* entre un 40 y 100% de las muestras procesadas (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2 Porcentaje de re-aislamiento en plántulas de durazno de cinco meses de edad inoculadas con cinco aislamientos fúngicos, después de 15 días de inoculadas.

Fecha de inoculación	Tratamiento		Muestra infectada	Pigmentación de la colonia aislada	Hongo re-aislado	Porcentaje de aislamiento	Porcentaje de contaminantes o sin crecimiento	
Hongo inoculado: 30/03/07	6D		R1	Sólo corteza	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	100	-
				Tallo sin corteza	Púrpura, inmerso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
				Raíz	Púrpura inmerso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
	R2			Sólo corteza	Púrpura algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
				Tallo sin corteza	Púrpura. algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
				Raíz	Púrpura inmerso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
	R3			Sólo corteza	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
				Tallo sin	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	100	-

			corteza				
			Raíz	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	100	-
	15A	R1	Sólo corteza	Blanco	<i>F. oxysporum</i>	100	-
			Tallo sin corteza	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	100	-
			Raíz	Blanco algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
		R2	Sólo corteza	Blanco y rosa pálido, algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
			Tallo sin corteza	Blanco algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
			Raíz	Blanco algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
		R3	Sólo corteza	Blanco y rosa pálido, algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
			Tallo sin corteza	Blanco y rosa pálido, algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
			Raíz	Púrpura pálido	<i>F. oxysporum</i>	100	-
Hongo inoculado:	<i>G. roseum</i>						
	13D	R1	Sólo corteza	Blanco amarillo, amarillo al reverso	<i>G. roseum</i>	100	-
			Tallo sin corteza	Blanco amarillo, amarillo al reverso	<i>G. roseum</i>	100	-
			Raíz	Blanco amarillo, amarillo al reverso	<i>G. roseum</i>	100	-
		R2	Sólo corteza	Blanco amarillo, amarillo al reverso	<i>G. roseum</i>	100	-
			Tallo sin corteza	Blanco, amarillo al reverso	<i>G. roseum</i>	40	60
			Raíz	Blanco amarillo, amarillo al reverso	<i>G. roseum</i>	100	-
		R3	Sólo corteza	Blanco algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	20	80
			Tallo sin corteza	Sin crecimiento	-	-	-
			Raíz	Blanco amarillo, amarillo al reverso	<i>G. roseum</i>	60	40
Hongo inoculado:	<i>V. albo-atrum</i>						
31/0/07	13'	R1	Sólo corteza	Blanco grisáceo	<i>V. albo-atrum</i>	20	80
			Tallo sin corteza	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	20	80
			Raíz	Blanco grisáceo	<i>V. albo-atrum</i>	20	80
		R2	Sólo corteza	Blanco algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	20	80
			Tallo sin corteza	Blanco algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	20	80
			Raíz	Blanco algodónoso	<i>F. oxysporum</i>	40	60
		R3	Sólo corteza	Blanco algodónoso		60	40
			Tallo sin corteza	Blanco grisáceo	<i>V. albo-atrum</i>	20	80
			Raíz	Blanco crema	<i>V. albo-atrum</i>	20	80
Hongo inoculado:	<i>Dematophora</i> sp.						
			Sólo corteza	Blanco crema	<i>Dematophora</i>	20	20
	Ag	R1		Blanco amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>	60	

Sin hongo inoculado	R2	Tallo sin corteza	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	80	20
		Raíz	Blanco crema	<i>Dematophora</i>	20	20
			Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	
		Sólo corteza	Blanco crema	<i>Dematophora</i>	20	
			Púrpura algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	20
		Tallo sin corteza	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Raíz	Blanco crema	<i>Dematophora</i>	20	80
		Sólo corteza	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	80	20
		R3	Tallo sin corteza	Blanco	40	
			amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>		
			Púrpura algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	40	20
		Raíz	Blanco crema	<i>Dematophora</i>	40	60
	Testigo R1	Sólo corteza	Púrpura pálido	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		Tallo sin corteza	Blanco crema	<i>F. solani</i>	20	80
		Raíz	Contaminante	-	60	40
		Sólo corteza	Púrpura algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
		Tallo sin corteza	Púrpura pálido, algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
		Raíz	Púrpura pálido, algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	60	40
		R3	Sólo corteza	Blanco	20	80
			algodonoso	<i>F. oxysporum</i>		
			Púrpura pálido	<i>F. oxysporum</i>	20	80
		Raíz	Sin crecimiento	-	-	-
Sin tratamiento*	Planta 1	Sólo corteza	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	40	60
		Tallo sin corteza	Blanco amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>	100	-
		Raíz	Púrpura pálido	<i>F. oxysporum</i>	40	60
	Planta 2	Sólo corteza	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	100	-
		Tallo sin corteza	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	60	
			Blanco amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>	40	-
	Planta 3	Raíz	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	40	60
		Sólo corteza	Blanco algodonoso	<i>F. oxysporum</i>	80	20
		Tallo sin corteza	Blanco amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>	80	
			Púrpura pálido	<i>F. oxysporum</i>	20	-
		Raíz	Rosa pálido	<i>F. oxysporum</i>	40	
			Blanco amarillento, margen naranja	<i>F. solani</i>	20	40

*Plantas a las que no se les dio tratamiento de incubación, a diferencia de las testigo y las inoculadas.

Las plantas denominadas sin tratamiento, aún cuando no se les dio el mismo proceso de incubación, se utilizaron para el proceso de reaislamiento con fines de comparación, lo que sirvió para reafirmar el resultado obtenido con las testigo, ya que también mostraron necrosis en los tejidos vasculares y asimismo se re-aislaron de muestra de raíz y tallo los hongos *F. oxysporum* y *F. solani*, los cuales no fueron inoculados.

4.3.6. Identificación morfológica

Aún cuando algunas colonias de *Fusarium* reaisladas tuvieron variación en la coloración de la colonia con respecto al aislamiento original, se identificaron las mismas especies inoculadas de *F. oxysporum*, *G. roseum*, *V. albo-atrum* y *Dematophora* sp. Sólo fue diferente *F. solani*, ya que esta especie no se inoculó en plántulas y sí se reaisló de muestras de raíz y tallo.

Al respecto de *F. oxysporum* varios autores reportan que la coloración de las colonias es de blanco a rosa, durazno, salmón, púrpura o violeta (Booth, 1971; Domsch *et al.*, 1980; Nelson *et al.*, 1983; Burgess *et al.*, 1994).

4.3.7. Identificación molecular

Se comprobó la identificación morfológica de: *F. oxysporum*, *Verticillium albo-atrum*, *G. roseum*, *Dematophora* sp., y *F. solani* (este último no fue inoculado en este ensayo). Los reaislamientos PP-17-17, PP-19-19, PP-23-23, PP-24-24, PP-61-25 y PP-26-26 (Cuadro 2.12 en Capítulo II) que aparentemente fueron diferentes por su variación en pigmentación y forma de crecimiento de las colonia se confirmó su identificación como especies de *F. oxysporum*. Estos resultados se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito en el Capítulo II.

4.4. CONCLUSIONES

1. Se indujeron los síntomas de marchites defoliación y muerte de plántulas en condiciones de incubación en laboratorio.
2. *F. oxysporum* y *G. roseum* causaron síntomas de marchites, defoliación en el follaje, y necrosamiento de haces vasculares en tallo, raíz principal y raicillas.
3. Los tratamientos inoculados con *V. albo-atrum* y *Dematophora* mostraron síntomas de marchites y las hojas quedaron adheridas al morir la planta. *V. albo-atrum* se reaisló de muestras de tallo y raíz y *Dematophora* sólo de raíz y de la corteza del tallo.
4. Los cuatro géneros inoculados se reaislaron consistentemente de muestras de tallo y raíz con necrosamiento de haces vasculares de 40 al 100 %.
5. En plantas testigo sin inocular, también hubo marchitez y defoliación, pero el tallo permaneció verde cuando el de las inoculadas se secó. Asimismo se observó necrosamiento de raíz y se aisló *F. oxysporum* y *F. solani*.
6. En las plantas sin incubar (sin tratamiento) aunque también fueron afectadas por el proceso de desinfestación, mostraron necrosis de tejidos vasculares de raíz y se aisló *F. oxysporum* y *F. solani*, al igual que en las plantas testigo.

Inferencias:

7. Se indujo que el patrón utilizado como material propagativo fue infectado por hongos causantes de marchites y muerte desde el vivero donde fueron producidos.
8. La desinfestación superficial de raíces no eliminó a los hongos latentes en éstas por estar posiblemente colonizando tejidos internos de la raíz.

9. El posible debilitamiento de las plántulas por la desinfestación de raíces y cambio de sustrato, aceleró la infección y expresión de síntomas de los hongos inoculados.
10. En futuras inoculaciones se debe dejar un periodo de uno a dos meses para que las plántulas se recuperen del estrés sometido por el tratamiento en punto ocho, y para proseguir con la inoculación.

4.5. LITERATURA CITADA

- Abdou, Y. A., O. M. Mousa, and A. M. Abd-El-Malek. 1982. Studies on seedling decline of stone fruits. *Egyptian Journal of Phytopathology* 14: 93-102.
- Burgess, L. W., A. B. Summerell, S. Bullock, P. K. Gott, and D. Backhouse. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. Universidad de Sydney, Australia. 133 p.
- Booth, C. 1978. *Fusarium equiseti*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 1978, No. 58. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Inglaterra.
- Corazza, L., and G. Chilosi. 1986. Behaviour of some stone fruit rootstocks towards *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale* 11: 113-116.
- Domsch, K. H., W Gams, and T. H. Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Academia Press. London. 859 p.
- Elías, R. R., J. G Reyes, y M. J. Aquino. 2007. Identificación y propuesta de manejo de enfermedades de raíz del durazno en el sur del Estado de

ANEXOS

2.1. Formato datos de campo

Fecha _____ Localidad _____ Municipio _____
Propietario _____ Tel. _____

Nombre del predio _____ Has. _____ Origen de la plántula _____
Tratamiento preventivo de plántulas _____

Datos del cultivo anterior (tipo, fecha de cambio de uso del suelo) _____

Dist./surco _____ Dist. Planta _____ Plantas/Ha. _____ Temporal _____ Riego _____

Maleza	Hoja ancha	Hoja angosta	Otras
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____

Productos químicos aplicados	Insecticidas	Fungicidas	Otros
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____
	_____	_____	_____

Fertilización	de base	durante el ciclo
	_____	_____
	_____	_____
	_____	_____

Sintomatología observada _____

Signos observados _____

2.2. Solución de Hipoclorito al 1.5 % (para 250 mL de solución)

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Blanqueador "Cloralex" al 6%.....	62.52 mL
Agua destilada.....	187.5 mL

Procedimiento. Para obtener la concentración deseada de la solución (1.5 %)

se utiliza la siguiente fórmula: $V_1C_1 = V_2C_2$

Donde:

V_1 = Volumen necesario de cloro para preparar 100 mL de solución al 1.5 %;

C_1 = Concentración inicial del cloro (6%);

V_2 = Volumen final de la solución (250 mL)

C_2 = Concentración final de la solución (1.5%)

Por lo tanto:

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{250 \times 1.5}{6} \\ &= 62.5 \text{ mL de cloro} \\ 250 - 62.5 &= 187.5 \text{ mL de agua destilada} \end{aligned}$$

Mezclar las cantidades correspondientes de agua y cloro.

2.3. a. Medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Papas peladas en trozos.....	200 g
Agar.....	18 g
Dextrosa.....	12 g
Agua destilada.....	1,000 ml

Procedimiento. En un matraz con 500 ml de agua destilada colocar los trozos de papa y cocerlos a 120 °C (15 lb) durante 15 minutos. Después pasar el caldo por una manta de cielo, colectarlo en un vaso de precipitados y aforarlo a un litro. Distribuir la solución en partes iguales en dos matraces (500 ml en cada uno). Previamente a cada matraz agregar 9 g de agar y 6 g de dextrosa. Esterilizar el medio a 15 lb de presión por 15 minutos, dejar enfriar a 30 °C y vaciar en cajas de Petri.

2.3. b. Medio líquido Papa-Dextrosa.

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Papas peladas en trozos.....	200 g
Dextrosa.....	12 g
Agua destilada.....	1,000 ml

Procedimiento. En un matraz con 500 ml de agua destilada colocar los trozos de papa y cocerlos a 120 °C (15 lb) durante 15 minutos. Después pasar el caldo por una manta de cielo, colectarlo en un vaso de precipitados y aforarlo a un litro. Distribuir la solución en partes iguales en dos matraces (500 ml en cada uno). Previamente a cada matraz agregar 6 g de dextrosa. Esterilizar el medio a 15 lb de presión por 15 minutos, dejar enfriar a 30 °C y vaciar.

2.4. Medio de cultivo Papa-Zanahoria-Agar (PCA por sus siglas en inglés)

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Papas peladas en trozos.....	20 g
Zanahoria pelada en trozos.....	20 g

Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1,000 ml

Procedimiento. La papa y la zanahoria se mezclan con 500 mL de agua destilada, se esteriliza durante 15 minutos a 120 °C. Después el extracto se afora a 1000 mL le agrega el agar y se esteriliza a 120 °C por 15 min.

2.5. Medio de cultivo Jugo V-8

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Jugo de 8 verduras (V8) <i>Campbell's</i>	300 mL
Carbonato de calcio.....	4 g
Agar.....	18 g
Agua destilada.....	1,000 mL

Procedimiento. Mezclar el jugo V8 con el carbonato de calcio, agitar la solución para homogenizarla y centrifugar durante 20 minutos a 5,000 rpm. Pasar el sobrenadante de los tubos por una manta de cielo, colectarlo en un vaso de precipitados y aforarlo a un litro (desechar el material sedimentado). Distribuir la solución en partes iguales en dos matraces (500 ml en cada uno). Previamente a cada matraz agregar 9 g de agar-agar. Esterilizar el medio a 15 lb de presión por 15 minutos, dejar enfriar a 30 °C y vaciar en cajas de Petri.

2.6. Medio de cultivo Extracto de Malta-Agar (EMA)

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Extracto de Malta.....	10 G
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1,000 ml

Procedimiento. Se esteriliza a 120 °C por 15 min.

Tris	100 mM
EDTA.....	100 mM
NaCl.....	250 mM

4.1. Solución de hipoclorito de sodio al 10% volumen-volumen

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
Blanqueador "Cloralex" al 6%.....	100 mL
Agua destilada.....	900 mL