ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES DE LA INFLORESCENCIA DE MANGO (*Mangifera indica* L.).

Por
Manuel Pérez Cuevas
Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos

para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
en
PROTECCIÓN DE CULTIVOS
UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2010

Aprobado por:

Irma Cabrera, M. S. Miembro, Comité Graduado	Fecha
Consuelo Estévez de Jensen, Ph. D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
Raúl E. Macchiavelli, Ph. D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
Lydia I. Rivera Vargas, Ph. D. Presidente, Comité Graduado	Fecha
Sandra Cruz Pol, Ph. D. Representante Estudios Graduados	Fecha
Hipólito O' Farrill, Ph. D. Director del Departamento	Fecha

ABSTRACT

In Puerto Rico, mango (*Mangifera indica* L.) is one of the most important fruits of the agricultural industry with a market value of $ 8.7 million in 2007. Inflorescence diseases and pests are the main constraints for mango production, causing a low production of fruits and reducing its potential. The purpose of this study was to describe symptoms and characterize pathogenic fungi associated with inflorescence diseases. Symptomatic and asymptomatic inflorescences were collected from four mango cultivars (Keitt, Haden, Irwin and Parvin) at seven flowering stages. Inflorescences were examined for the following symptoms: powdery mildew, necrosis, tip blight and malformation. For fungal morphological identification, colonies were described on acidified PDA medium and microscopic slides were prepared to examine fungal reproductive structures. Molecular identification of fungal species was made through DNA analysis of the ITS region of the rDNA. Pathogenicity tests were conducted with eleven fungal species frequently isolated during this study. Powdery mildew caused by *Oidium mangiferae* was the most common symptom. Necrosis was observed after the protected stage was developed. Malformation was not observed on inflorescences. The severity of the disease was determined for each flowering stage and cultivar of mango. Severity was higher in full blossom stage (G). Severity of symptoms was not significantly different among cultivars. The following genera of fungi were identified associated with mango's inflorescences: *Alternaria* spp., *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* spp., and *Phoma* sp. These were isolated from inflorescence showing necrosis in petals and/or rachis as well as asymptomatic inflorescences. In addition, *Alternaria* spp., *Botryosphaeria* spp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* spp., *Gelasinospora*

sp., and *Phomopsis* spp. were identified from inflorescences affected with tip blight. Pathogenicity tests showed that *Alternaria alternata*, *Botryosphaeria rhodina*, *B. parva*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Phomopsis* sp. were pathogenic to mango inflorescences.

RESUMEN

En Puerto Rico, el mango (*Mangifera indica* L.) es una de las frutas más importantes de la industria agrícola, con un valor de mercado de 8.7 millones de dólares en 2007. Las enfermedades de la inflorescencia y las plagas son las mayores limitaciones para la producción de mango, causando baja producción de frutos y reduciendo el potencial del árbol. El propósito de este estudio fue describir la sintomatología de las enfermedades de la inflorescencia y caracterizar los hongos patógenos asociados. Se colectaron muestras de inflorescencias sintomáticas y asintomáticas en siete etapas de floración en cuatro cultivares de mango (Keitt, Haden, Irwin y Parvin). Las inflorescencias fueron examinadas para los siguientes síntomas: añublo polvoriento, necrosis, quemazón y malformación. Para la identificación morfológica de los hongos se describieron las colonias en medio de cultivo PDA acidulado y se prepararon laminillas de microscopio para examinar estructuras reproductivas de los hongos. La identificación molecular de las especies de hongos se realizó a través de análisis de la región ITS del ADN ribosomal. Se realizaron pruebas de patogenicidad utilizando once especies de hongos frecuentemente aislados durante este estudio. El añublo polvoriento fue el síntoma más común. La necrosis se observó a partir de la etapa de floración conocida como estado protegido. No se observaron síntomas de malformación de la inflorescencia. Se determinó la severidad de los síntomas para cada etapa de floración y para cada cultivar de mango. La severidad fue mayor en la etapa de floración G en los cuatro cultivares, sin embargo, entre cultivares no se observaron diferencias significativas. Los siguientes géneros de hongos se identificaron asociados a las inflorescencias del mango:

Alternaria spp., *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Pestalotiopsis* sp., *Phomopsis* spp. and *Phoma* sp. Estos fueron aislados de inflorescencias que mostraban necrosis en pétalos y/o raquis, así como también de inflorescencias asintomáticas. En adición, *Alternaria* spp., *Botryosphaeria* spp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* spp., *Gelasinospora* sp., and *Phomopsis* spp. fueron aislados de inflorescencias que mostraban quemazón. Las especies *Alternaria alternata*, *Botryosphaeria parva*, *B. rhodina*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phomopsis* sp. resultaron patogénicas a las inflorescencias del mango.

DEDICATORIA

A mi adorada esposa Bethania A. Mateo Féliz por su paciencia, comprensión y apoyo en la realización de mis estudios de maestría. A mis padres Bienvenido y Carmen por su dedicación. A mis hermanos Francisco, Yesenia, Nancy y Deysi por tanto cariño incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo a Dios todopoderoso, quien siempre me tiene presente y me guía en los caminos de la vida. De manera muy especial a la Dra. Lydia I. Rivera Vargas por brindarme la oportunidad de participar en el proyecto H - 425 y por ser partícipe de mi formación profesional, gracias por su paciencia. A mis amigos Laura, Ixia, Edward, José Miguel y Alejandro. Al Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales y todo su personal por estar siempre dispuestos a colaborar con los estudiantes. A la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, Antes, Ahora y Siempre Colegio. A la Dra. Felícita Varela por sus consejos y su amistad sincera. A la Sub-estación Experimental Agrícola de Juana Díaz, en especial a la Dra. Consuelo Estévez por su colaboración. A la Universidad ISA y al Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal Dominicano (CEDAF) por el apoyo durante mis estudios de maestría.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN ..... **IV**

DEDICATORIA ..... **VI**

AGRADECIMIENTOS ..... **VII**

TABLA DE CONTENIDO ..... **VIII**

LISTA DE FIGURAS ..... **X**

LISTA DE CUADROS ..... **XI**

LISTA DE APÉNDICES ..... **XII**

1. INTRODUCCIÓN **1**

OBJETIVOS 3

2. REVISIÓN DE LITERATURA **4**

2.1. DESCRIPCIÓN DE LOS CULTIVARES DE MANGO UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO 7
2.1.1. Haden 7
2.1.2. Irwin 8
2.1.3. Keitt 8
2.1.4. Parvin 9
2.2. ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS EN LAS INFLORESCENCIAS DE MANGO 9
2.2.1. El tizón o quemazón de la inflorescencia: 10
2.2.1.1. Botryosphaeriaceae 11
2.2.2. Añublo polvoriento 16
2.2.3. La mancha necrótica: 17
2.2.4. La malformación de la inflorescencia del mango: 18

3. MATERIALES Y MÉTODOS **21**

3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS 21
3.2. SINTOMATOLOGÍA, SEVERIDAD E ÍNDICE DE LA ENFERMEDAD 24
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 25
3.4. AISLAMIENTO DE LOS HONGOS 26
3.5. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LAS INFLORESCENCIAS DEL MANGO. 27
3.5.1. Identificación morfológica 27
3.5.1.1. Cultivos monospóricos 28
3.5.2. Identificación molecular 28
3.5.2.1. Extracción de ADN de los hongos 28
3.5.2.2. Amplificación de la región ITS 29
3.5.2.3. Secuenciación del producto de PCR 31
3.5.2.4. Edición y alineamiento de secuencias 31
3.6. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD 34

4. RESULTADOS **36**

4.1. SINTOMATOLOGÍA E ÍNDICE DE SEVERIDAD 36
4.1.1. Añublo polvoriento: 39
4.1.2. Necrosis 40

4.1.3. Quemazón de la inflorescencia 40
4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LAS INFLORESCENCIAS DE MANGO 41
CUADRO 6. CANTIDAD DE AISLADOS POR ETAPAS DE FLORACIÓN DEL MANGO. 42
4.3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y CULTURALES DE LOS HONGOS AISLADOS 42
4.3.1. Morfología de *Alternaria alternata* (Fries) Keissler 42
4.3.2. Morfología de *Alternaria* spp 43
4.3.4. Morfología de *Botryosphaeria parva* Pennycook y Samuels: 44
4.3.5. Morfología de *Botryosphaeria ribis* Grossenb. y Duggar 45
4.3.6. Morfología de *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld y H. Schrenk 46
4.3.7. Morfología de *Giberella intricas* Wollenw 48
4.3.9. Morfología de *Haematonectria haematococca* (Berk. y Broome) Samuels y Nirenberg 49
4.3.10. Morfología de *Fusarium oxysporum* (Schlcht.) Snyder y Hansen 50
4.3.11. Morfología de *Albonectria rigidiuscula* (Berkely y Brick) Rossman y Samuels 50
4.3.12. Morfología de *Cochliobolus lunatus R.R. Nelson & F.A. Haasis* 51
4.3.14. Morfología de *Gelasinospora* sp. Dowding 52
4.3.15. Morfología de *Pestalotiopsis mangiferae* (Henn.) Steyaert 53
4.3.16. Morfología de *Didymella exigua* (Niessl) Sacc 53
4.3.17. Morfología de *Phomopsis longicolla* Hobbs 54
4.3.18. Morfología de *Phomopsis* sp. Punith 55
4.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR 56
4.5. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD 56
4.5.1. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler 57
4.5.2 *Botryosphaeria rhodina* 58
4.5.3. *Botryosphaeria parva* 58
4.5.4. *Colletotrichum gloeosporioides* 59
4.5.5. *Phomopsis* sp 60

5. DISCUSIÓN 61

6. CONCLUSIONES 65

7. RECOMENDACIONES 67

8. LITERATURA CITADA 68

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

Figura 1. Sub-estación Experimental Agrícola de Juana Díaz del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico (Juana Díaz, P. R.). **A**) Huerto de mango muestreado……... 22

Figura 2. Etapas de floración del mango siguiendo la clasificación de Schoeman y Manicom (1995). A) elevación a ruptura del brote, B) oreja de ratón, C) estado protegido, D) coloreado verde, E) coloreado rojizo F) coloreado rojizo abierto y G) flor completa…….. 23

Figura 3. Escala de severidad para necrosis de 0 a 4). A) inflorescencia asintomática, B) severidad 1, C) severidad 2, D) severidad 3 y E) severidad 4, basado en la escala de severidad desarrollado por Lonsdale y Kotzé (1993)….……. 25

Figura 4. Sintomatología observada en el campo en las inflorescencias del mango. A) Inflorescencia asintomática, B) añublo polvoriento, C) necrosis en flores individuales, D) manchas necróticas elipsoidales E) añublo polvoriento y necrosis en raquis secundario y F) necrosis en pétalos y raquis secundario…… 37

Figura 5. Porcentaje de severidad por etapas de floración en los cultivares de mango Parvin, Haden, Irwin y Keitt …….……..... 38

Figura 6. Inflorescencias mostrando síntomas de añublo polvoriento e inflorescencia sana. (A) inflorescencia asintomática, B), C) y D) inflorescencias con añublo polvoriento en etapas de floración coloreado verde, coloreado rojizo abierto y flor completa respectivamente……... 39

Figura 7. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler. A) colonia en medio de cultivo APDA, B) conidias producidas en cadena in situ y C) conidias……... 42

Figura 8. *Alternaria* sp. (A y B) colonias en medio de cultivo APDA, (C y D) conidias… 43

Figura 9. *Botryosphaeria rhodina* (anamorfo = *Lasiodiplodia theobromae*). A) colonia en medio de cultivo APDA, B) conidias inmaduras y C) conidias maduras…… 44

Figura 10. *Botryosphaeria parva* (anamorfo = *Neofusicoccum parum* A) colonia en medio de cultivo APDA, B) picnidio (barra = 30 µm), c) conidias y D) células conidiógenas……... 45

Figura 11. *Botryosphaeria ribis* (Grossenb y Duggar). A) colonia en medio de cultivo APDA, B) conidias y C) picnidio inmaduro (Barra = 35 µm)….…….. 46

Figura 12. *Glomerella cingulata.* A) colonia en medio de cultivo APDA del aislado H - 172 G (20-04) y B) ascas con ascosporas…….. 47

Figura 13. *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. A) Colonia en medio de cultivo APDA y B) macroconidias…… 48

Figura 14. *Haematonectria haematococca* teleomorfo de *Fusarium solani* Mart. A) colonia en medio de cultivo APDA, B) macroconidioforo, C) macroconidias, D y E) ascas con ascosporas…….. 49

Figura 15. *Fusarium oxysporum* (Schlcht.) Snyder & Hansen. A) colonia en medio de cultivo APDA y B) macroconidias……. 50

Figura 16. *Albonectria rigidiuscula* (Berkely & Brick) Rossman y Samuels en su fase asexual (*Fusarium decemcellulare*). A) colonia en medio de cultivo APDA, B) reverso de colonia y C) macro y microconidias…….. 51

Figura 17. *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. A) Colonia en APDA y B) conidióforo y conidias……... 52

Figura 18. *Gelasinospora* sp. A) peritecios in situ en medio de cultivo APDA B), peritecios y C) Ascospora…….. 52

Figura 19. *Pestalotiopsis mangiferae*. A) colonia en medio de cultivo APDA y conidias… 53

Figura 20. *Dydimella exigua* (anamorfo = *Phoma exigua*). A) picnidio y conidias y B) colonia en medio de cultivo APDA …..……. 54

Figura 21. *Phomopsis longicolla* Hobbs. A) colonia en medio de cultivo APDA B) conidias beta (β-conidias) y C) conidias alfa (α-conidias)……. 55

Figura 22. *Phomopsis* sp. A) colonia en medio de cultivo APDA y B) conidias beta……... 55

Figura 23. Manchas necróticas elípticas causadas por *Alternaria alternata* en inflorescencias del mango. A) sintomatología producida y B) colonia en medio de cultivo APDA……. 57

Figura 24. Quemazón causada por *Botryosphaeria rhodina* en inflorescencia de mango. A) síntomas en cv. Haden y B) colonia en medio de cultivo APDA….…… 58

Figura 25. Necrosis causada por *Botryosphaeria parva* en inflorescencia del mango. A) lesión en raquis y B) colonia en medio de cultivo APDA……. 59

Figura 26. Necrosis del raquis y de las flores causada por *Colletotrichum gloeosporioides* A) sintomatología observada en el cv. Haden y B) colonia en medio de cultivo APDA.…… 59

Figura 27. Lesiones necróticas en el raquis de las inflorescencias del mango causadas por *Phomposis* sp. A) sintomatología en cv. Haden y B) colonia en medio de cultivo APDA... 60

LISTA DE CUADROS

Cuadro **Página**

Cuadro 1. Descripción de las etapas de floración del mango (*Mangifera indica* L.)……..... 5

Cuadro 2. Número de accesión al GenBank para los aislados de hongos asociados a las inflorescencias del mango en cultivares comerciales…… 32

Cuadro 3. Hongos utilizados durante las pruebas de patogenicidad realizadas en inflorescencias de mango en condiciones de campo (EEA. Juana Díaz)…….. 35

Cuadro 4. Porcentaje de inflorescencias sintomáticas (necrosis) y asintomáticas por etapa de floración……..... 40

Cuadro 5. Distribución de los géneros de hongos encontrados por cada cultivar de mango……..... 41

Cuadro 6. Cantidad de aislados por etapas de floración del mango..……..... 42

LISTA DE APÉNDICES

Apéndices **Página**

Apéndice 1. Análisis estadísticos……..... 74

1. INTRODUCCIÓN

El mango, *Mangifera indica* L., pertenece a la familia Anacardiaceae y se cultiva en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Ploetz et al., 1994). La producción mundial de mango aumentó rápidamente durante la década pasada componiendo el 50 % de todas las frutas tropicales producidas (Jedele et al., 2003). En el 2005 se produjeron 27,965,750 tm de mango a nivel mundial (FAOSTAT, 2007), siendo la India el mayor productor con cerca de la mitad de la producción. El segundo país mayor productor es China, seguido por Méjico y Tailandia (Arauz, 2000). La mayor parte de los países que producen mango son naciones en desarrollo con un enorme potencial para aumentar su producción y satisfacer la demanda de los países desarrollados. Muchos países como Brasil, Colombia, Ecuador, Venezuela, Perú, Méjico, Guatemala, Nicaragua, Honduras, República Dominicana y Haití exportan sus mangos a los Estados Unidos y Europa (Cohen et al., 2001).

En Puerto Rico, el mango es la fruta más importante de la industria con un valor de mercado de 18.5 millones de dólares para el año 2005 al 2006. El valor de mercado del mango se ha reducido en los últimos años. Para el 2007 fue de 8.7 millones de dólares y los datos preliminares para el año 2008 reflejan un valor de mercado de 7.86 millones de dólares (Puerto Rico's Department of Agriculture, 2008). Esto significa una reducción considerable en la producción. La competencia de otros países exportadores de mango ha forzado a mejorar la producción, aspecto, calidad y precio del mango.

Las enfermedades de la inflorescencia y las plagas son las mayores limitaciones para la producción de mango, causando una baja producción de la fruta y reduciendo su potencial. En Puerto Rico existe poca información documentada sobre las enfermedades causadas por hongo en el cultivo de mango, principalmente de aquellas que afectan las inflorescencias. Existen diversos hongos patógenos que han sido reportados como causantes de daños a la inflorescencia del mango, entre ellos: *Botryosphaeria ribis, B. parva, B. dothidea, Oidium mangiferae, Alternaria alternata, A. tenuissima, Colletotrichum gloeosporioides, C. gloeosporioides* var. *minor, Fusarium spp. F. proliferatum* y *F. oxysporum.* (Ramos et al., 1991, Ploetz et al., 1996, Ploetz, 2003, Slippers et al., 2004., Slippers et al., 2005). Las principales enfermedades que afectan la inflorescencia del mango son la mancha necrótica, el añublo polvoriento, la malformación de la inflorescencia y el tizón o quemazón de la inflorescencia (Lonsdale y Kotzé, 1993; Marasas, et al., 2006; Ploetz et al., 2006). La etiología de estas enfermedades es poco conocida y por ende su manejo y control son limitados, lo cual refleja la importancia de realizar este estudio para caracterizar morfológica y molecularmente los hongos patógenos asociados a enfermedades de la inflorescencia de mango en Puerto Rico. La identificación correcta de los patógenos que afectan la inflorescencia de mango es indispensable para el control efectivo de los mismos y para el desarrollo de regulaciones cuarentenarias.

Objetivos

1. Describir la sintomatología y aislar los hongos asociados a la inflorescencia del mango en los cultivares comerciales Keitt, Haden, Irwin y Parvin.

2. Determinar la severidad de los síntomas como necrosis, añublos polvorientos, quemazón y malformación de la inflorescencia del mango.

3. Caracterizar morfológica y molecularmente las especies de hongos fitopatógenos asociados a la inflorescencia del mango.

4. Realizar pruebas de patogenicidad a nivel de campo con los aislados de los hongos más frecuentes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

El mango pertenece al género *Mangifera* de la familia Anacardiaceae. El género *Mangifera* contiene varias especies que producen frutos comestibles, de las cuales la especie *Mangifera indica* L. es la más importante. El mango es originario de Asia tropical, probablemente del este de la India y Myanmar (Bally, 2006). Dentro de la especie *M. indica* hay dos tipos, los cuales se pueden distinguir por su modo de reproducción y por sus respectivos centros de diversidad: El grupo subtropical (tipo Indio) con semillas monoembriónicas y el grupo tropical (Sureste de Asia) con semillas poliembriónicas (Litz, 2009). En el presente el mango se encuentra en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo como cultivo comercial, árbol de jardín o como sombra para el ganado. (Bally, 2006).

El árbol de mango puede crecer desde 10 hasta 30 m de altura y sus ramas pueden alcanzar los 38 m alrededor del árbol. Las raíces alcanzan una profundidad de hasta 6 m (Morton, 1987). Las hojas son simples, sin estípula y alternas con peciolo de 1 a 12 cm de largo. Las hojas son variables en forma y tamaño, pero usualmente son oblongas con puntas que varían de redondeadas a acuminadas. La forma de las hojas varía entre variedades pero es más consistente dentro de una variedad.

Las flores nacen en inflorescencias o panículas terminales, pueden alcanzar hasta 60 cm de largo en algunas variedades, peden ser hermafroditas y masculinas, ocurriendo ambos tipos en la misma inflorescencia. Las flores hermafroditas son pequeñas (5 a 10

mm) con 4 a 5 sépalos pubescentes y 4 a 5 pétalos oblongos, lanceolados y pubescentes. Las flores masculinas son similares a las flores hermafroditas, pero sin pistilo, el cual ha sido abortado (Bally, 2006). El número total de flores en una panícula puede variar desde 1,000 hasta 6,000, dependiendo del cultivar. La cantidad inicial de frutas del mango se relaciona directamente con la proporción de flores perfectas (hermafroditas), aunque el conjunto final de las frutas no depende necesariamente de esta relación. Parece ser que la proporción de flores perfectas en un cultivar para una producción óptima de frutas comienza a ser crítica cuando dicha proporción está por debajo del 1% (Litz, 2009). La floración del mango se ha dividido en siete etapas, desde la brotación hasta la apertura de todas las flores individuales (Schoeman y Manicom, 1995) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de las etapas de floración del mango (*Mangifera indica*) (Schoeman y Manicom, 1995).

Etapa de floración	**Descripción de la etapa**
(A) Elevación a apertura del brote	Etapa inicial
(B) Oreja de ratón	Elongación de las brácteas y emergencia de la inflorescencia.
(C) Estado protegido	Elongación de las inflorescencias aún protegidas por las brácteas.
(D) Coloreado verde	Mayor elongación de la inflorescencia y apertura de raquis secundario, flores aun en estado de brote.
(E) Coloreado rojizo	Elongación final de la inflorescencia y enrojecimiento del raquis.
(F) Coloreado rojizo abierto	Flores individuales comienzan a abrirse desde la base de la inflorescencia.
(G) Flor completa	Todas las flores individuales abiertas.

El fruto del mango es clasificado como una drupa. Las frutas de variedades diferentes pueden ser muy variables en forma, color y textura. La forma de las frutas varía de redonda, ovalada, oblonga a larga. Las frutas pueden pesar de menos de 50 g a más de 2 kg (Bally, 2006).

Basándose en su modo de reproducción por semillas, el mango puede ser clasificado en dos grupos: monoembriónico y poliembriónico. En general, las semillas monoembriónicas se encuentran el grupo sub-tropical (Tipo Indio) y las semillas poliembriónicas se encuentran el grupo tropical (Sureste de Asia). Las semillas monoembriónicas del mango contienen un único embrión zigótico que produce una sola plántula que es probablemente de origen híbrido (Litz, 2009). Las semillas poliembriónicas en cambio, pueden contener uno o más embriones, uno de los cuales es usualmente, pero no siempre zigótico (Litz, 2009).

Existen más de mil variedades de mango alrededor del mundo. India cuenta con más de 500 de variedades. En Hawaii, países como India, México y Florida se han introducido y cultivado muchas variedades de mango desde el comienzo del siglo XX. Desde ese tiempo se han mejorado y cultivado muchos patrones, siendo seleccionados por sus características, como la calidad de la fruta (sabor, aroma, textura de la masa y fibra) así como el tamaño y aspecto externo del fruto. Las preferencias por variedades de mango difieren entre países, regiones, identidades étnicas y los mercados en los cuales son consumidos. Las variedades destinadas a la exportación son seleccionadas por la habilidad de mantener la calidad de la fruta después de largos periodos postcosecha. Las

adaptaciones de una variedad a las presiones ambientales de sequía, humedad durante la floración, temperatura, plagas de insectos y enfermedades son también criterios de selección importantes, porque ellos determinan la consistencia de cultivo y la calidad de fruta (Bally, 2006).

En Puerto Rico se cultiva mango desde el año 1750. En 1948 la Universidad de Puerto Rico introdujo sobre 150 variedades para un proyecto de mejoramiento del mango (Morton, 1987). Las principales siembras comerciales de mango se encuentran en costa sur de isla. Las compañías Martex Farms y Sucesores Serralles son las mayores productoras y exportadoras de la fruta en la isla. Se exporta cerca del 90% de la producción hacia Europa. Estas empresas cultivan mayormente el cultivar Keitt. Además, posee huertos de Tommy Atkins y Parvin.

2.1. Descripción de los cultivares de mango utilizados en este estudio

2.1.1. Haden:

El árbol es de copa extendida, produce durante junio y julio en Puerto Rico (Toro, 1988). El fruto es de color amarillo brillante de color rojo carmesí y de forma ovalada, con una base redondeada, 10.5 a14 cm de largo por 9 a10.5 cm de ancho, con un peso de 510 a 680 g, la piel es gruesa, dura y adherente, la pulpa es firme y jugosa, con abundante fibra, de color amarillo oscuro, rica y dulce con un aroma agradable y calidad de buena a excelente. Las semillas son monoembriónicas (Litz, 2009). Las frutas del cultivar Haden

son susceptibles a antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y altamente susceptibles a la mancha negra bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*) (Ploetz et al., 1994).

2.1.2. Irwin:

Es un árbol pequeño a mediano, moderadamente vigoroso y de copa abierta. El fruto es de color amarillo brillante, de forma ovalada y con base redondeada, 11.5 a 13 cm de largo, 8 a 9 cm de ancho, 6.5 a 7.5 cm de grosor, con un peso de 340 a 450 g. La cáscara es de espesor medio, tierna y adherente, la pulpa es suave, tierna, jugosa, sin fibra, de color amarillo limón, dulce, con un leve aroma agradable y de buena calidad (Litz, 2009). En Puerto Rico esta variedad produce frutas en racimos durante julio a agosto (Toro, 1988). Este es un cultivar altamente susceptible a la antracnosis y susceptible a la mancha negra bacteriana (Ploetz et al., 1994).

2.1.3. Keitt:

El árbol produce ramas arqueadas y largas y una apariencia abierta desigual. El porte es alto y produce en promedio 218 frutas (Toro, 1988). La fruta es de color amarillo verdoso, con numerosos puntos pequeños de color blanco, con tintes rosados a rojos, de forma ovalada y base redondeada con 13 a 15 cm de largo, 9 a 11 cm de ancho y 8.5 a 10 cm de grosor, con peso de 510 a 2,000 g. La cáscara es gruesa, resistente y adherente. La pulpa es firme y jugosa, con poca fibra, de color amarillo limón, dulce y de aroma

agradable (Litz, 2009). Produce de septiembre a octubre y en Puerto Rico se considera la mejor de las variedades tardías (Toro, 1988). Las frutas de este cultivar son moderadamente resistentes a la antracnosis (*C. gloeosporioides*) y altamente susceptible a la mancha negra bacteriana (Ploetz et al., 1994).

2.1.4. Parvin:

El árbol es vigoroso y con copa de forma redondeada y densa. La fruta es de tamaño mediano, de forma ovoide a oblonga, con una longitud de 11.5 a 14 cm y 9 a 10.5 cm de ancho, un peso 450 a 690 g (560 en promedio). La cáscara de la fruta es gruesa, dura, fácil de separar de la pulpa y de color amarillo verdosa con un brillo rojizo recubriendo 2/3 de la superficie de la fruta. La pulpa es firme, jugosa, con escasa fibra y con un color amarillo pronunciado. La descomposición o ruptura interna es, en ocasiones, un problema con este cultivar. El sabor es dulce y con un fuerte aroma agradable. El árbol es muy productivo y produce de julio a agosto (Toro, 1988). En Florida se considera una variedad medio tardía.

2.2. Enfermedades causadas por hongos en las inflorescencias de mango

Varios hongos han sido asociados a daños en la inflorescencia de mango. En África del Sur, Lonsdale y Kotzé (1993) reconocieron cuatro enfermedades que afectaban la inflorescencia de mango: tizón o quemazón de la inflorescencia, manchas de la inflorescencia, malformación de la inflorescencia y añublo polvoriento. La malformación

de la inflorescencia se ha reportado también otros países productores de mango entre los que se encuentran Brasil, Egitpto, El Salvador, Florida, Israel, India, Malasia, Méjico, Pakistán, Uganda, y Venezuela (Marasas, et al., 2006; Ploetz et al., 2006). La mancha necrótica se ha reportado en Australia y Florida (Ploetz, 2003; Rivera et al., 2006).

2.2.1. El tizón o quemazón de la inflorescencia:

El tizón o quemazón de la inflorescencia es descrito por Ploetz (2003) esta enfermedad comienza con una marchitez en la cual el pedúnculo se curva y necrotiza, secándose desde la punta. Como resultado de esto, las flores y los frutos pequeños son abortados y los frutos más grandes se momifican. La enfermedad puede afectar tanto el tallo de la inflorescencia como las flores individuales. Sobre el tallo aparecen lesiones de color negro a marrón oscuro. El tizón también puede afectar los frutos pequeños y los grandes provocando aborto de los mismos. Los frutos se momifican y son colonizados saprofíticamente por *Colletotrichum gloeosporioides*, que esporula abundantemente sobre los mismos (Akem, 2006). El tizón o quemazón se ha asociado a un complejo de hongos patógenos dentro de los cuales se encuentran varias especies de *Botryosphaeria* (= *Fusicoccum* spp.) (Lonsdale y Kotzé, 1993; Ploetz, 2003). Recientemente se demostró que *Botryosphaeria parva* (anamorfo = *Neofusicoccum parvum*) es el patógeno más común, causante de la pudrición de tallos y frutos, muerte regresiva y tizón de la inflorescencia en mango (Slippers *et al*., 2005). Los autores mencionan que *B. parva* es a menudo confundida con *B. ribis* y *B. dothidea* (Ramos et al., 1991; Ploetz *et al.*, 1996; Slippers et al., 2004). Por el contrario, *B. dothidea* (anamorfo = *Fusicoccum aesculi*), otra

especie relacionada con mango, es de poca importancia como patógeno y menos común que *B. parva* y *Fusicoccum mangiferum* y posiblemente actúa como endófito. El teleomorfo de *F. mangiferum* no ha sido descrito; el estado sexual es raramente producido en medio de cultivo, mientras que las etapas asexuales son muy comunes. Existe mucha confusión en la taxonomía de *B. parva, B. ribis* y *B. dothidea* a causa de la amplia gama de hospederos y similitudes morfológicas entre especies, además de que el envejecimiento de la conidia afecta su morfología y complica la identificación. La conidia tiende a envejecer sólo después de ser descargada del picnidio, y su color y septación cambian con la edad (Slippers et al., 2004).

2.2.1.1. Botryosphaeriaceae

El género *Botryosphaeria* fue introducido por Cesati y De Notaris en 1863 y enmendado por Saccardo en 1877. Esta basado en la especie tipo, *Botryosphaeria dothidea*. Es un género rico en especies y con distribución cosmopolita, ocurriendo en un amplio rango de hospederos (Crous et al., 2006). El teleomorfo *Botryosphaeria* produce típicamente ascosporas hialinas y aseptadas. Sin embargo, se ha reportado que algunas especies pueden producir ascosporas de color marrón y septadas con la edad (Alves et al., 2008).

Al menos 18 géneros anamorfos han sido asociados con *Botryosphaeria*. Denman et al. (2000) reconocen sólo dos de ellos, estos son: *Fusicoccum* y *Diplodia*, sin embargo, debido a la gran variedad morfológica encontrada en anamorfos de *Botryosphaeria*,

parece más acertado pensar que lo propuesto por Denman et al. (2000) es probablemente demasiado conservador, aunque sugieren que *Lasiodiplodia* podría ser sinónimo de *Diplodia*. Los autores que han trabajado con el grupo de las Botryosphaeriaceas aceptan a *Lasiodiplodia* como un género distinto (Burgess et al., 2006, Alves et al., 2008). Burgess et al. (2006) reconocieron tres nuevas especies dentro del género *Lasiodiplodia* en especies de Eucalipto (*Eucalyptus urophylla*), Acacia (*Acacia mangium*), Casuarina (*Casuarina cunninghamii*), Cacao (*Theobroma cacao*), Roble (*Quercus* sp.), Pistacho (*Pistacia* sp.), entre otras plantas. Los autores se basaron en el tamaño y forma de las conidias y la presencia de estrías verticales, lo cual es característico de este género. Las nuevas especies son: *Lasiodiplodia crassispora*, *L. rubropurpurea* y *L. venezuelensis*. No se encontraron estructuras de reproducción sexual para estas especies, pero por inferencia filogenética utilizando dos regiones genómicas: la región espaciadora de transcripción interna de ADN ribosomal (ITS del rADN) y el factor de alargamiento (EF- 1α) para hacer las comparaciones, los autores concluyen que pertenecen al género *Botryosphaeria* (Burgess et al., 2006).

Burgess et al. (2006) sugieren mantener el género *Lasiodiplodia* y no reducirlo a sinónimo de *Diplodia* como habían considerado Denman et al. (2000), debido a que todas las especies del género *Lasiodiplodia* están agrupadas en un Clado altamente apoyado, cercano o relacionado al Clado de las especies de *Diplodia* y *Dothiorella*, pero distinto. Además, la adición de tres nuevas especies hace mayor la cohesión e independencia de este Clado.

Dentro del género *Dothiorella*, Phillips et al. (2005) incluyen dos nuevas especies de *Botryosphaeria* con conidias oscuras. Estas son *Dothiorella sarmentorum* y *D. iberica*. Basándose en la combinación de las regiones ITS y EF-1α, estas dos especies forman un Clado, parecido a *Lasiodiplodia*, pero distinto de *Diplodia* (Phillips et al., 2005, Burgess et al., 2006).

Las especies dentro de los géneros *Diplodia*, *Dothiorella* y *Lasiodiplodia* están claramente separadas del género *Fusicoccum* por sus conidias de paredes gruesas y de un ancho promedio menor (Phillips et al., 2005). Cuando maduran, las conidias de *Diplodia*, *Dothiorella* y *Lasiodiplodia* son oscuras y septadas, sin embargo, las de *B. stevensii* y *B. corticola* son mayormente hialinas y a menudo aseptadas (Denman et al 2000, Burgess et al., 2006).

Las conidias de las especies recientemente descritas: *B. iberica*, *B. sermentorum* y *B. viticola* se tornan de color marrón y con un septo temprano en su desarrollo (Phillips et al., 2005). Los tamaños de las conidias de *Diplodia*, *Dothiorella* y *Lasiodiplodia* se solapan, aunque generalmente las conidias de *Lasiodiplodia* son más amplias y ovoides. Otra característica que distingue a *Lasiodiplodia* de *Diplodia* y *Dothiorella* es el estriado vertical en las conidias maduras de *Lasiodiplodia* (Von Arx, 1974). Burgess et al. (2006) creen que los argumentos antes expuestos son razonables para mantener a *Lasiodiplodia* como un género distinto a *Diplodia* y *Dothiorella* (Burgess et al., 2006).

Recientemente se describieron las especies *B. sarmentorum* y *B. iberica*, las cuales no son habituales en este género, debido a sus ascosporas de color marrón y la presencia de un septo (Phillips et al., 2005). El análisis filogenético basado en secuencias de la región ITS y EF -1α, colocan estas especies dentro de un Clado que contiene especies con anamorfos de *Fusicoccum*. Sin embargo, el color marrón y la presencia de un septo en las ascosporas no corresponden al género anamorfo *Fusicoccum* (Phillips et al., 2005). En base a su filogenia y morfología, el anamorfo de *B. sarmentorum* y *B. iberica* pertenece a un género distinto a aquellos actualmente reconocidos como géneros anamorfos asignados a *Botryosphaeria*. A través de un estudio de las especies de *Dothiorella*, este género ha resurgido recientemente para dar cabida a anamorfos de *Botryosphaeria* con ascosporas de color marrón y que presentan un septo (Phillips et al., 2005).

Los anamorfos se encuentran más frecuentemente encontrados en la naturaleza y su esporulación puede inducirse en medio de cultivo, mayormente agar de agua (WA) o agar de agua suplementado con pedazos esterilizados de tejidos del hospedero (Slippers y Wingfield, 2007). Las conidias son mucho más diversas en forma y tamaño que las ascosporas asociadas. Las características de las conidias que pueden ser utilizadas para la descripción e identificación de las especies de *Botryosphaeria* incluyen grosor de las paredes, ornamentación, madurez, color, septación, forma y tamaño (Slippers y Wingfield, 2007).

El análisis de la secuencia de ADN de dos regiones genómicas: ITS de rADN y el gen de la β- tubulina combinado con datos morfológicos (i.e. picnidio y conidia) han confirmado que el hongo identificado previamente en mango como *Dothiorella* pertenece al género *Fusicoccum*. Slippers y Wingfield, (2007) han propuesto que los aislados previamente reportados como *D. mangiferae* o *N. mangiferae* (anteriormente *Hendersonia creberrima*) podrían ser llamados *F. mangiferum*. Además, aislados de *D. aromatica* se identificaron como *F. aesculi* (teleomorfo = *B. dothidea*). Finalmente ellos mencionan que una especie de *Fusicoccum* (= *Dothiorella*) en mango de Australia y Tailandia probablemente sea una especie no descrita. Los autores no consideran esta especie de importancia como causante de enfermedades pre y post cosecha en mango (Slippers et al., 2005). Los hongos del género *Botryosphaeria* son un ejemplo único de lo confusa que es la caracterización morfológica y demuestra la importancia de expandir estos estudios en Puerto Rico.

Los cultivos de *Botryosphaeria* se pueden distinguir de la mayoría de los otros hongos por su color gris a negro, micelio aéreo y pigmento grisáceo a negro visible en el reverso del plato de Petri. La apariencia y color del micelio aéreo y los pigmentos ayudan en la delimitación y la rápida identificación de taxones de *Botryosphaeriaceae* que sean morfológicamente similares, resultando de gran utilidad para una primera agrupación de los aislamientos en un muestreo amplio (Slippers y Wingfield, 2007).

La mayoría de los estudios taxonómicos utilizando secuencias de ADN (ejemplo, región ITS del rDNA) pueden subestimar la verdadera diversidad de especies entre

especies extremadamente similares, por lo tanto se han utilizado múltiples secuencias de genes para determinar si se han pasado por alto o identificadas dudosamente las especies crípticas (Slippers y Wingfield, 2007). La identificación de las especies es de gran importancia para el control de la enfermedad, el establecimiento de regulaciones cuarentenarias y el estudio de la epidemiología de las diferentes especies del hongo (Slippers et al., 2005).

2.2.2. Añublo polvoriento:

El añublo polvoriento es causado por el hongo *Oidium mangiferae* Bert., un ascomiceto perteneciente al Orden Erysiphales. *Oidium mangiferae* estuvo presente en la India antes de 1874. En Brasil fue reportado por primera vez en el año 1914, en Hawaii en 1983 y subsecuentemente se reportó en muchos otros países, encontrándose distribuido ampliamente en la región del Pacífico (Nelson, 2008). Es una enfermedad importante de la inflorescencia del mango (Johnson et al., 1991; Ploetz, 2003; Prakash, 2003). En plantaciones de mango con cultivares susceptibles en regiones propensas al añublo polvoriento, se esperaría que la enfermedad ocurra cada año o estacionalmente. Para lograr buenos rendimientos, los productores deben actuar con medidas de control durante la floración, para evitar la pérdida de la cosecha (Nelson, 2008). El teleomorfo no ha sido descrito para esta especie. El hongo es un parásito obligado que afecta todas las partes de la inflorescencia, además de frutos, ramas jóvenes y hojas. El hongo crece sobre las panículas afectadas las cuales se tornan necróticas. Además las panículas sin frutos o con frutos pequeños pueden abortar (Ploetz, 2003). En África del Sur, los síntomas

aparecen entre dos hasta tres semanas después que el 20% de las inflorescencias se ha desarrollado en el cultivar “Tommy Atkins”, específicamente en las etapas de floración conocidas como coloración rojiza o rojiza abierta, causando pérdidas entre 80 hasta 90% en la producción (Schoeman y Manicom, 1995).

La máxima infección con añublo polvoriento ocurre a 26˚C y humedad relativa de 100%, aunque puede causar infección con temperaturas de 15 hasta 32˚C (Gupta, 1989). La temperatura atmosférica es el factor más importante para el inicio y desarrollo epidémico de la enfermedad bajo condiciones de campo. El rango de temperatura entre los 11 hasta 14˚C (mínimo) y 17 hasta 31˚C (máximo) junto con una humedad relativa moderada (64 hasta 74%) favorece el desarrollo del añublo polvoriento en mango (Gupta, 1989). Aparentemente, la precipitación no es importante en el desarrollo de la enfermedad, por el contrario, condiciones secas en la atmosfera favorecen el desarrollo de la misma (Gupta, 1989). El mango es el único hospedero de *O. mangiferae* (Gupta, 1989; Nelson, 2008).

2.2.3. La mancha necrótica:

Otra enfermedad fungosa de la inflorescencia de mango es la mancha necrótica causada por varias especies de hongos; entre estas, *Alternaria* spp. y *Colletotrichum gloeosporioides*. En la India, *Alternaria alternata* y *A. tenuissima* han sido reportadas afectando la inflorescencia del mango, lo que resulta en una disminución significativa de la producción de frutos (Prakash, 2003). En África, *A. alternata* se ha reportado

afectando las panículas y reduciendo la producción de frutos (Ploetz, 2003). En Australia, *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. gloeosporioides* var. *minor* se han reportado como agentes causales de este síntoma (Ploetz, 2003). Recientemente, un catastro de las especies de *Colletotrichum* spp., el agente causal de antracnosis en mango realizado en Puerto Rico y Florida (USA) demostró que *C. acutatum* afectaba flores y panículas de mango en muestras tomadas en Homestead, FL (Rivera et al., 2006). Esta especie no ha sido reportada para Puerto Rico.

2.2.4. La malformación de la inflorescencia del mango:

La malformación de la inflorescencia del mango fue reportada por primera vez en la India en 1981 (Marasas et al., 2006). Al presente se ha reportado en Asia (Israel, Malasia y Pakistán), en África (Egipto, África del Sur, Sudán, Swazilandia y Uganda) y en América (Brasil, El Salvador, Méjico, Nicaragua, Estados Unidos y Venezuela) (Marasas et al., 2006). En Pakistán, esta enfermedad es el factor más limitante para la producción de mango, causando pérdidas de 60% hasta 90% de cosecha. El término "malformación" se refiere a un desarrollo anormal de la inflorescencia que ocurre en árboles afectados (Ploetz, 2003). Los síntomas asociados con esta enfermedad son acortamiento, hinchazón y bifurcación de las inflorescencias, incremento del número y tamaño de las flores, flores masculinas estériles o abortadas y el desarrollo de hojas en las inflorescencias (Prakash, 2003; Marasas et al., 2006; Ploetz, 2006). Por muchos años, la etiología de esta enfermedad no estuvo definida, ya que muchos factores tales como anomalías fisiológicas, infecciones virales, infestación por el ácaro, *Aceria mangiferae* e

infecciones por hongos fueron sugeridas como factores y/o agentes causales de la enfermedad (Kumar et al., 1993). Algunos estudios indican que la presencia de *A. mangiferae* es importante en causar heridas a los árboles de mango y transferir los hongos patógenos desde y hacia los sitos de infección (Kumar et al., 1993; Ploetz et al., 1994; Gamliel-Atinsky et al., 2009). Actualmente se ha demostrado mediante postulados de Koch que *Fusarium mangiferae* (*Fusarium subglutinans*, anteriormente *F. moniliforme* var. *subglutinans*) aislado de tejidos florales es el agente causal de la malformación en África del Sur, Egipto, Israel y Florida. *F. mangiferae* produce macroconidias de 3 a 5 septos y microconidias de forma oval en falsas cabezas desde mono o polifiálidos. Estas características morfológicas son típicamente las mismas que describen la mayoría de los aislados previamente reconocidos como *F. subglutinans* (Britz et al., 2002). Además, otras especies de *Fusarium* se han asociado a esta enfermedad. *Fusarium sterilihyphosum* se aisló de tejido malformado en África del Sur y en Brasil; *Fusarium spp*. y *Fusarium proliferatum* en Malasia y *Fusarium oxysporum* en Egipto, Méjico e India, pero su patogenicidad no ha sido demostrada. Esta enfermedad no ha sido reportada en Puerto Rico.

Los avances en filogenética molecular y el uso de datos de secuencias de ADN han hecho posible distinguir diferentes especies asociadas con la enfermedad de malformación del mango tales como *F. mangiferae* y *F. sterilihyphosum* y diferenciarlas de otras especies que son morfológicamente similares (Marasas et al., 2006). Para las comparaciones de datos de secuencias de ADN en el género *Fusarium* han sido utilizadas

diferentes regiones genómicas, entre ellas, el factor de alargamiento 1α y el gen de β-tubulina (Kvas et al., 2008).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección de muestras

Se realizaron visitas semanales a un huerto de mango ubicado en la Sub-estación Juana Díaz del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico (Figura 1). La Estación Experimental Agrícola está ubicada en la zona suroeste de Puerto Rico, se encuentra en el kilómetro 3.1 de la carretera 510, Sabana Llana, Juana Díaz. Sus coordenadas geográficas son: Latitud N 18°01´811”, Longitud W 066°31´713” y 23 m.s.n.m. Los suelos predominantes pertenecen al orden Mollisol, serie San Antón de textura Franco-arcilloso, ligeramente ácidos y de alta fertilidad. La precipitación anual es de 1143 milímetros, y su temperatura promedio varía entre 21.1 y 27.8 ºC. La recolección de muestras de las inflorescencias de mango se realizó desde el 30 de noviembre de 2007 hasta el 20 de abril de 2008. Se tomaron muestras semanales de las inflorescencias de mango que presentaban síntomas de necrosis y/o añublos polvorientos, así como inflorescencias sanas en siete etapas de floración descritas por Schoeman y Manicom (1995). Estas son: A) elevación a la ruptura del brote, B) oreja de ratón, C) estado protegido, D) coloreado verde, E) coloreado rojizo F) coloreado rojizo abierto y G) flor completa (Figura 2). Se utilizaron tres árboles de los cultivares comerciales de mango: Keitt, Haden, Irwin y Parvin.

Las muestras de inflorescencias con síntomas de quemazón se colectaron semanalmente desde el 16 de enero hasta el 18 de marzo de 2009. Se colectaron dos inflorescencias por árbol por cultivar en cada muestreo y se aislaron los hongos en medio de cultivo agar de papa y dextrosa acidulado con ácido láctico al 25% (APDA Difco™ 39g/l). Las muestras se colocaron en bolsas plásticas debidamente identificadas y se transportaron refrigeradas al laboratorio de Fitopatología de Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, donde se procesaron.

Figura 1. Sub-estación Experimental Agrícola de Juana Díaz del Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico. Juana Díaz. P. R. **A**) Huerto de mango muestreado.

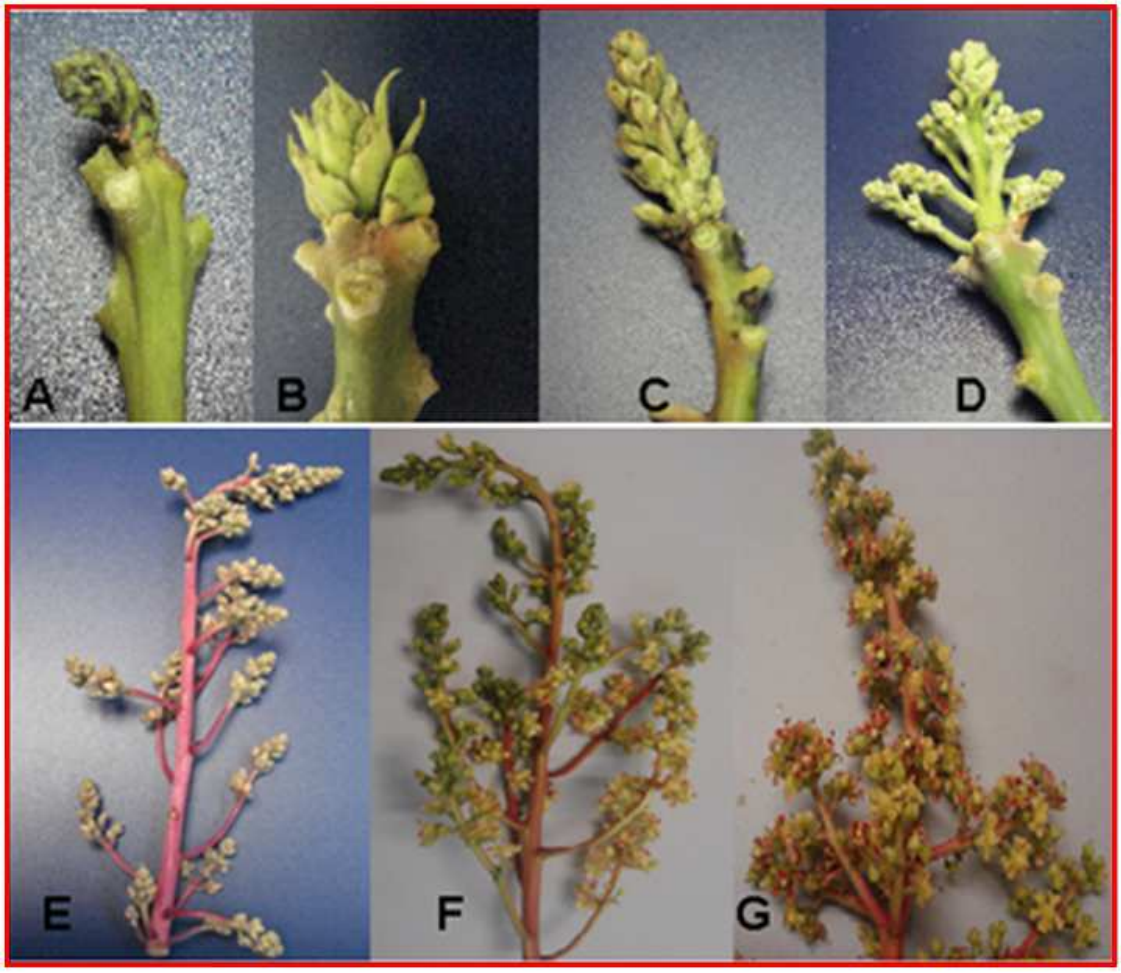

Figura 2. Etapas de floración del mango siguiendo la clasificación de Schoeman y Manicom (1995). A) elevación a ruptura del brote, B) oreja de ratón, C) estado protegido, D) coloreado verde, E) coloreado rojizo F) coloreado rojizo abierto y G) flor completa.

3.2. Sintomatología, severidad e índice de la enfermedad

Se observaron 236 inflorescencias de mango en distintas etapas de floración para describir la sintomatología y determinar la severidad de la enfermedad en cada etapa de la floración (Schoeman y Manicom, 1995). La severidad se definió como el porcentaje del área de la inflorescencia necrotizada o cubierta por micelio respecto al tamaño total de la inflorescencia. Para ello se utilizó una escala visual desarrollada por Lonsdale y Kotzé, (1993). Esta escala es de 0 hasta 4, donde 0 es la inflorescencia sin la enfermedad, 1 = 1-25 % de área afectada, 2 = 26-50 % de área afectada, 3 = 51-75 % de área afectada y 4 = > 75 % de área afectada (Figura 3). La severidad se expresó en términos de esta escala y se determinó para cada etapa de floración y para cada cultivar de mango. De cada inflorescencia se recolectaron datos tales como código del árbol, cultivar de mango, etapa de floración y sintomatología observada. Se seleccionaron tres árboles al azar por cada cultivar de mango y se evaluaron inflorescencias en las distintas etapas de floración presentes en el árbol en cada muestreo. Las inflorescencias se seleccionaron en base a su disponibilidad en el árbol y la presencia o ausencia de síntomas. El índice de severidad se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Indice de Severidad} = \left(\frac{\sum \text{puntuaciones individuales}}{\text{\# inflorescencias evaluadas}} \right) \times \left(\frac{100}{\text{4 (máximo de la escala)}} \right)$$

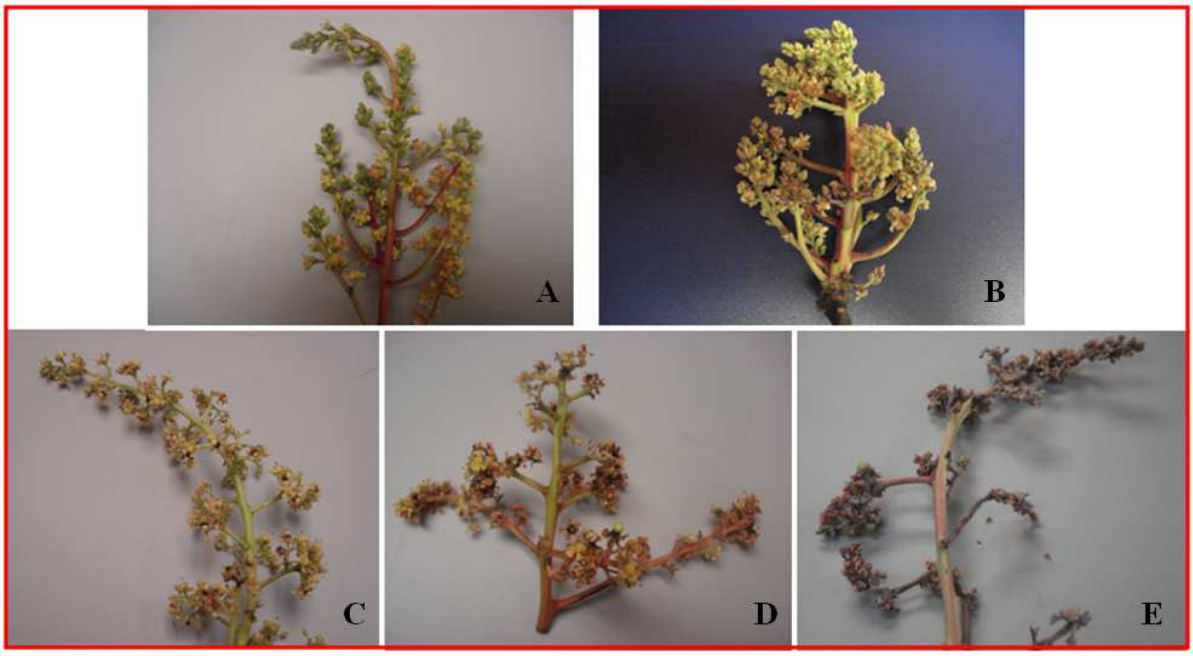

Figura 3. Escala de severidad para necrosis de 0 a 4). A) inflorescencia asintomática, B) severidad 1, C) severidad 2, D) severidad 3 y E) severidad 4, basado en la escala de severidad desarrollado por Lonsdale y Kotzé (1993).

3.3. Análisis estadístico

Se recolectaron datos de la severidad de la enfermedad para cada etapa de floración del mango y para cada cultivar de mango utilizado. Los datos se analizaron con el programa de análisis estadístico InfoStat (InfoStat, Versión 2008). Se realizaron análisis de varianzas para la variable índice de severidad para comparar las etapas de floración en cada cultivar de mango. Las medias de índice de severidad se compararon utilizando la prueba de Tukey (α = 0.05). La gráfica correspondiente al índice de severidad por etapas de floración y por cada cultivar de mango se realizó utilizando el programa Excel.

3.4. Aislamiento de los hongos

Los hongos se aislaron de inflorescencias sintomáticas y asintomáticas tomadas de cada árbol de cada cultivar de mango. Se analizaron un total de 236 muestras de inflorescencias distribuidas por etapas de floración de la siguiente manera: Etapa A = 25 inflorescencias, etapa B = 30 inflorescencias, etapa C = 29 inflorescencias, etapa D = 35 inflorescencias, etapa E = 35 inflorescencias, etapa F = 39 inflorescencias y etapa G = 43 inflorescencias. De cada inflorescencia se tomaron cinco secciones de tejido, que fueron desinfestadas superficialmente con etanol al 70 % e hipoclorito de sodio al 0.5 %. Luego, se lavaron con agua destilada deionizada estéril. El tejido se mantuvo en cada solución durante 1 minuto. Las secciones de tejido se transfirieron a placas petri con medio de cultivo de papa-dextrosa agar acidulado (APDA Difco™ 39g/l). Los aislados se incubaron a 28 ºC en una incubadora (VWR Scientific, PA, USA) durante 4 a 7 días. Las colonias de hongos se purificaron transfiriéndolas de 2 a 4 veces a platos de petri nuevos con medio de cultivo APDA.

3.5. Identificación morfológica y molecular de los hongos asociados a las inflorescencias del mango.

3.5.1. Identificación morfológica

Para la identificación de los hongos se prepararon laminillas semipermanentes con lactofenol para observar las estructuras reproductivas bajo el microscopio (Olympus U-TV1X-2, Japón). Se tomaron fotografías de las estructuras observadas con una cámara PaxCam (modelo PS-CM) utilizando el programa PAX – IT versión 6.7a. Para la identificación morfológica de los hongos se utilizaron claves taxonómicas apropiadas. Para las especies de *Alternaria* se utilizó la clave de Simmons, (2007), para *Botryosphaeria* se utilizaron las claves de Crous et al., (2006), Slippers et al., (2005), Para las especies de *Fusarium* se utilizaron las claves de Leslie y Summerell, (2006) y Booth, (1971), para otros hongos se utilizaron las claves Barnett y Hunter, (1998), Boerema et al., (2004) y Hanlin, (1990). Se describieron las colonias de acuerdo al color del micelio en el medio de cultivo APDA. Para cada hongo se midieron 50 conidias (largo y ancho en µm). Para estimular la esporulación de los hongos se utilizaron diferentes medios de cultivos como agar de agua (WA), agar de agua con hojas de clavel (CLA) (Leslie y Summerell, 2006), agar de agua con trozos de inflorescencias de mango esterilizados (Slippers y Wingfield, 2007) y agar de papas y zanahoria (PCA) (Simmons, 2007).

3.5.1.1. Cultivos monospóricos

Para los hongos aislados se realizaron cultivos monosporicos (French y Herbert, 1980). De cada hongo se realizaron diluciones de esporas hasta obtener aproximadamente 10 esporas/ml utilizando un microcopio (Olympus U-TV1X-2, Japón). Después se transfirió 1 ml de la solución de esporas a un plato petri con medio de cultivo APDA y se incubó a temperatura ambiente. Después que las esporas germinaron (12 – 24 horas) se transfirió una espora germinada a cada un de tres platos petri nuevos con medio de cultivo APDA. Los cultivos monosporicos se incubaron en una incubadora (VWR Scientific, PA, US) a una temperatura de 28 ºC.

3.5.2. Identificación molecular

3.5.2.1. Extracción de ADN de los hongos

Para cada aislado, se tomaron de 2 a 3 discos de micelio de 1 cm de diámetro aproximadamente y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril de 2 ml de capacidad. Se colocaron de 3 a 6 esferas de cristal de 5 mm de diámetro por cada tubo (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). La extracción de ADN se realizó utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, California, USA), de acuerdo a las instrucciones del manufacturero, incrementando el período de incubación de 15 a 60 minutos. El proceso de extracción consistió en una incubación de la muestra con buffer AP1 y RNasa en baño de maría por

60 minutos a 65 ºC aplicando vortex cada 15 minutos. Luego se centrifugó por 2 minutos a 13,500 rpm, el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf nuevo, se agregó el buffer AP2, se invirtió el tubo varias veces y se colocó en hielo por 5 minutos, luego se centrífugó por 5 minutos a 13,500 rpm y se transfirió el sobrenadante al filtro de color violeta. Se centrífugó por 2 minutos a 13,500 rpm y se transfirió el fluido a un tubo de columna transparente. Se agregó buffer AP3/E y se mezcló con la punta de la pipeta. Se centrífugó y se descartó el fluido. El pellet fue lavado dos veces utilizando el buffer AW. El filtro se colocó en un tubo de colección nuevo. El ADN se retiró del filtro utilizando el buffer AE mediante centrifugación (Qiagen, California, USA). El ADN extraído se transfirió a un tubo nuevo y se refrigeró a -20° C hasta ser utilizado para la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Colton y Clack, 2001).

3.5.2.2. Amplificación de la región ITS

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores ITS1 (TCC GTA GGT GAA CTT GCG G) e ITS4 (TCCTCC GCT TAT TGA TAT GC) (White et al., 1990). El volumen de reacción fue de 50 µl. La reacción contenía 25 µl de Amplitaq Gold® (Roche, New Jersey, USA), 17 µl de agua ultrapura (Sigma, St. Louis, MO), 1.5 µl de cada primer a 12 pmol, 5 µl de ADN a 20-30 ng/µl. La amplificación se realizó usando un termociclador (Pelkin Elmer Modelo 2400).

Para la amplificación de la región ITS de las otras especies de hongos se utilizaron las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial del ADN por 4

minutos a 94 ºC, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 30 segundos a 55 ºC, 1 minuto (+3 segundos / ciclo a 72 ºC). Al final se realizó una extensión por 4 minutos a 72 ºC (modificación de Konstantinova et al., 2002).

Para los aislados identificados como *Colletotrichum* spp., se amplificó la región ITS del ADN ribosomal, para ello se utilizaron los iniciadores ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) acoplado con el primer *Cg*Int (GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG) para *C. gloeosporioides* o *Ca*Int2 (GGG GAA GCC TCT CGC GG) para *C. acutatum* en un volumen de reacción de 50 µl (Brown et al., 1996; Mills et al., 1992; White et al., 1990; Rivera et al., 2006). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial del ADN por 5 minutos a 95 ºC, seguida por 35 ciclos de 45 segundos a 95 ºC, 75 segundos a 55 ºC, para *Cg*Int o 69 ºC para *Ca*Int2, 2 minutos (+3 segundos / ciclo a 72 ºC. Al final se realizó una extensión de la banda por 5 minutos a 72 ºC.

Una vez concluido el PCR, el producto fue congelado a –20 ºC. El producto PCR fue visualizado en gel de agarosa (Fisher, New Jersey, USA) al 1.4 % utilizando bromuro de etidio en un sistema de documentación de electroforesis (BIO RAD). La electroforesis se realizó durante 40 minutos a 100 V, utilizando el amortiguador SB 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de las bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioleta y el programa Quantity one (versión 4.6.1, BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con una escalera de peso de 100 a 1000 bp llamada PCR marker (Sigma, St. Louis, USA).

El producto del PCR fue purificado utilizando el Kit de purificación de Qiagen (Qiagen, California, USA). Los productos de PCR purificados fueron almacenados a -20 ºC (Colton y Clark 2001).

3.5.2.3. Secuenciación del producto de PCR

Para la secuenciación del DNA se utilizaron los servicios de las Facilidades de Secuenciación y Genotipificación de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Río Piedras (Sequencing and Genotyping Facilities, University of Puerto Rico-Río Piedras). Estas facilidades utilizan un secuenciador ABI 3130xl (Applied Biosystems Genetic Analyzers, CA).

3.5.2.4. Edición y alineamiento de secuencias

Para la edición y alineamiento de las secuencias de nucleótidos se utilizó el programa Sequencher versión 4.9®. (Gene Codes Corporation MI, USA). Con las secuencias editadas se realizó un Blast en la base de datos del GenBank para compararlas con las secuencias homólogas presentes en el mismo. Luego se realizó el alineamiento para obtener la secuencia final de cada hongo. La secuencia final para cada hongo fue incorporada en el banco de genes para obtener los números de accesión (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de accesión al GenBank para los aislados de hongos asociados a las inflorescencias del mango en cultivares comerciales.

Número de aislado	**Resultado en BLAST**	**Número de Accesión**	**Homología (%)**
I – 140 G (17/02) (4)	*Botryosphaeria parva*	GU968412	99
K – 283 F (04/04) (6)	*Fusarium* sp.	GU968414	100
K – 282 D (04/04) (7)	*Phomopsis* sp.	GU968416	94
K – 283 G (04/04) (9)	*Fusarium decemcellulare*	GU968418	98
I – 141 G (20/12) (13)	*Colletotrichum gloeosporioides*	GU968420	95
I – 142 G (04/04) (17)	*Bipolaris specifera*	GU968422	96
K – 284 F (20/04) (18)	*Albonectria rigidiuscula*	GU968423	97
H – 172 G (17/02) (23)	*Curvularia* sp.	GU968426	97
K – 282 F (04/04) (29)	*Fusarium equiseti*	GU968428	98
K – 284 (1) 1 (4Q)	*Phomopsis* sp.	GU968413	97
P – 48 A (6Q)	*Botryosphaeria rhodina*	GU968415	98
K – 284 (1) 4 (8Q)	*Xylariales* sp.	GU968417	89
I – 140 B1 (12Q)	*Bipolaris specifera*	GU968419	95
H – 174 (1) (13Q)	*Botryosphaeria parva*	GU968421	92
K – 284 (1) (20Q)	*Botryosphaeria parva*	GU968424	97
P – 47 (2) (21Q)	*Botryosphaeria parva*	GU968425	98
H – 172 A (26Q)	*Fusarium* sp.	GU968427	96
I – 141 (1) (30Q)	*Diaporthe* sp.	GU968429	93
K- 282 (4) (38Q)	*Alternaria alternata*	GU968430	93

Cuadro 2. Número de accesión al GenBank para los aislados de hongos asociados a las inflorescencias del mango en cultivares comerciales (continuación).

No. de aislado	**Resultado en BLAST**	**Número de Accesión**	**Homologia (%)**
45Q	*Botryosphaeria parva*	GU968431	96
50Q	*Botryosphaeria parva*	GU968432	98
52Q	*Pestalotiopsis* sp.	GU968433	100
86Q	*Botryosphaeria parva*	GU968434	99
87Q	*Botryosphaeria parva*	GU968435	94
I – 142 D (02/03) (22)	*Colletotrichum gloeosporioides*	HM060599	98
K – 283 F (04/04) (6)	*Fusarium equiseti*	HM060593	99
I – 141 C (09/02) (3)	*Cochliobolus lunatus*	HM060592	92
H–133 A (05/02) (16)	*Pyrenochaeta romeroi*	HM060595	99
I – 142 D (12/01) (19)	*Cochliobolus* sp.	HM060596	95
K –283 E (04/04) (20)	*Alternaria* sp.	HM060597	89
K – 284 G (04/04) (2)	*Curvularia* sp.	HM060591	90
I – 141 G (02/03) (40)	*Curvularia* sp.	HM060600	96
K–283 G (04/04) (48)	*Cochliobolus lunatus*	HM060602	92
I – 142 G (18/03) (52)	*Botryosphaeria parva*	HM060603	97
73Q	*Botryosphaeria parva*	HM060604	90
75Q	*Botryosphaeria parva*	HM060605	97
76Q	*Botryosphaeria parva*	HM060606	93
VII	*Colletotrichum gloeosporioides*	HM060607	97

3.6. Pruebas de patogenicidad

Se realizaron pruebas de patogenicidad para 11 aislados de hongo obtenidos en árboles de mango en un huerto de la Subestación Juana Díaz. (Cuadro 3). Se seleccionaron inflorescencias asintomáticas del mango de las etapas de floración F y G de los cultivares Irwin y Haden. Las inflorescencias se desinfestaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 5% y luego se lavaron con agua destilada estéril. Para cada hongo se utilizaron cuatro puntos de inoculación (raquillas), en los cuales se colocaron discos de micelio, en dos puntos con heridas y en dos sin heridas. Para el tratamiento control se utilizaron discos de PDA. Las inflorescencias se cubrieron con bolsas plásticas transparentes. La humedad se mantuvo colocando algodón humedecido dentro de la bolsa. Los datos de sintomatología y severidad para cada hongo se tomaron a los 5 y 8 días después de la inoculación. A los 5 días después de la inoculación se retiraron las bolsas plásticas, se midieron las lesiones y se describieron los síntomas. A los 8 días después de la inoculación se colectaron las inflorescencias y se transportaron al laboratorio de fitopatología para ser procesadas. La severidad de los síntomas se expresó como un porcentaje de la raquilla que presento síntomas respecto al tamaño total de la misma.

Cuadro 3. Hongos utilizados durante las pruebas de patogenicidad realizadas en inflorescencias de mango en condiciones de campo (EEA, Juana Díaz).

Número del aislado	**Identificación**	**Sintomatología observada en el campo**
H – 172 G (17-02)	*Phoma exigua*	Necrosis en raquis de la inflorescencia
K – 283 -1 (07-02)	*Botryosphaeria rhodina*	Quemazón de la inflorescencia
H – 172 -3 (03/02)	*Botryosphaeria parva*	Quemazón de la inflorescencia
K – 284 -2 (05/02)	*Botryosphaeria parva*	Quemazón de la inflorescencia
H – 172 -1 (19-01)	*Albonectria rigidiuscula*	Asintomática
K – 283 G (04-04)	*Alternaria* sp.	Manchas necróticas
K – 282 - 4 (16-01)	*Alternaria alternata*	Quemazón de inflorescencia
K – 282 D	*Phomopsis* sp.	Asintomática
P – 49 A2 (16/01)	*Phomopsis* sp.	Asintomática
H – 172 G (17-02)	*Colletotrichum gloeosporioides*	Necrosis en pétalos y manchas necróticas en raquis
I – 141 G (20-12)	*Colletotrichum gloeosporioides*	Necrosis en pétalos

4. RESULTADOS

4.1. Sintomatología e índice de severidad

Los síntomas observados en las inflorescencias de mango examinadas fueron añublo polvoriento, necrosis en los pedúnculos y en las flores individuales, manchas necróticas, perforaciones con bordes necróticos en el raquis y quemazón de la punta de las inflorescencias. El añublo se presentó como un polvo blanco cubriendo principalmente el raquis secundario y las flores, en algunos casos cubriendo la totalidad de la inflorescencia, causando el aborto de flores y frutos. La necrosis se observó en los pétalos y en el raquis como manchas necróticas elipsoidales de color marrón oscuro a negro y manchas negras de forma irregular (Figura 4).

El 33.5% de las inflorescencias colectadas eran sintomáticas (necrosis y/o añublo polvoriento), el restante 66.5% de las inflorescencias colectadas no mostraron síntomas de enfermedad. No se observó malformación de la inflorescencia de mango en ninguno de los cultivares examinados.

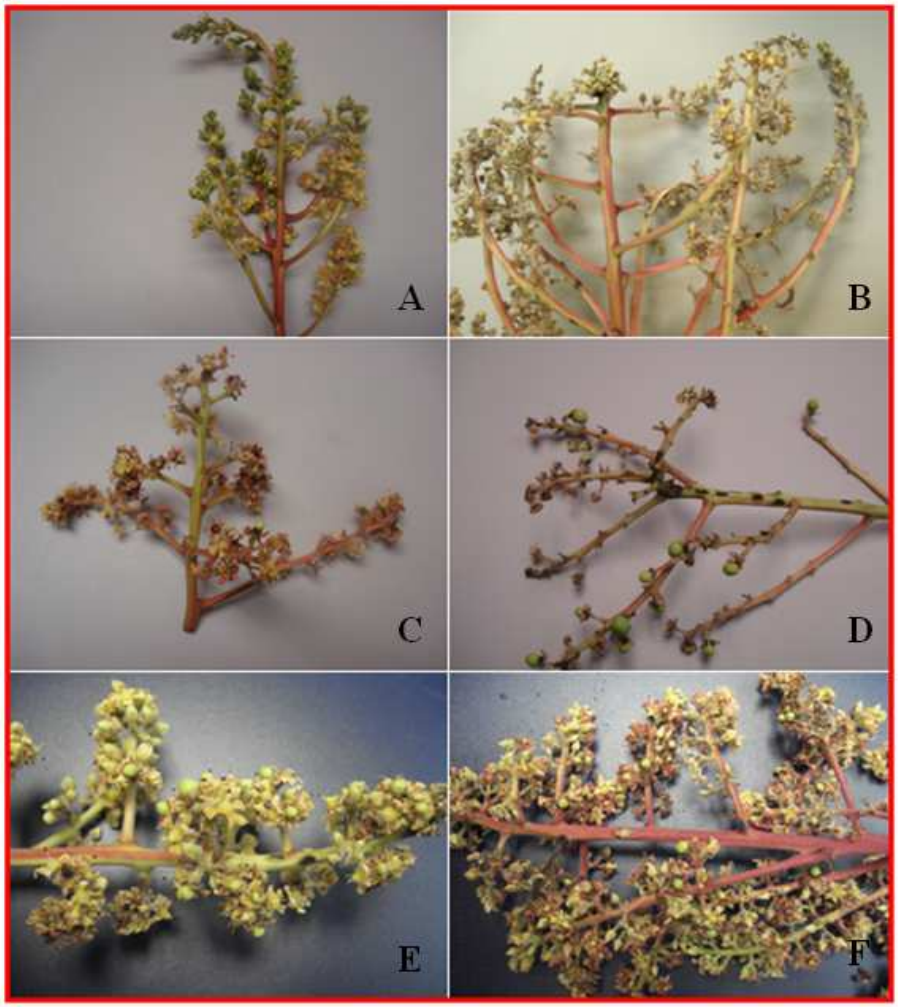

Figura 4. Sintomatología observada en el campo en las inflorescencias del mango. A) Inflorescencia asintomática, B) añublo polvoriento, C) necrosis en flores individuales, D) manchas necróticas elipsoidales E) añublo polvoriento y necrosis en raquis secundario y F) necrosis en pétalos y raquis secundario.

En las etapas de floración A y B no se observaron síntomas de enfermedad en ninguno de los cultivares evaluados. En las etapas de floración C, D, E y F la severidad promedio fue menor al 30%. La severidad en estas etapas no fue significativamente diferente. La severidad en etapa G (floración completa) fue significativamente diferente a las demás etapas en cada uno de los cultivares. Los cultivares de mango tuvieron un comportamiento similar a lo largo de las etapas de floración (figura 5).

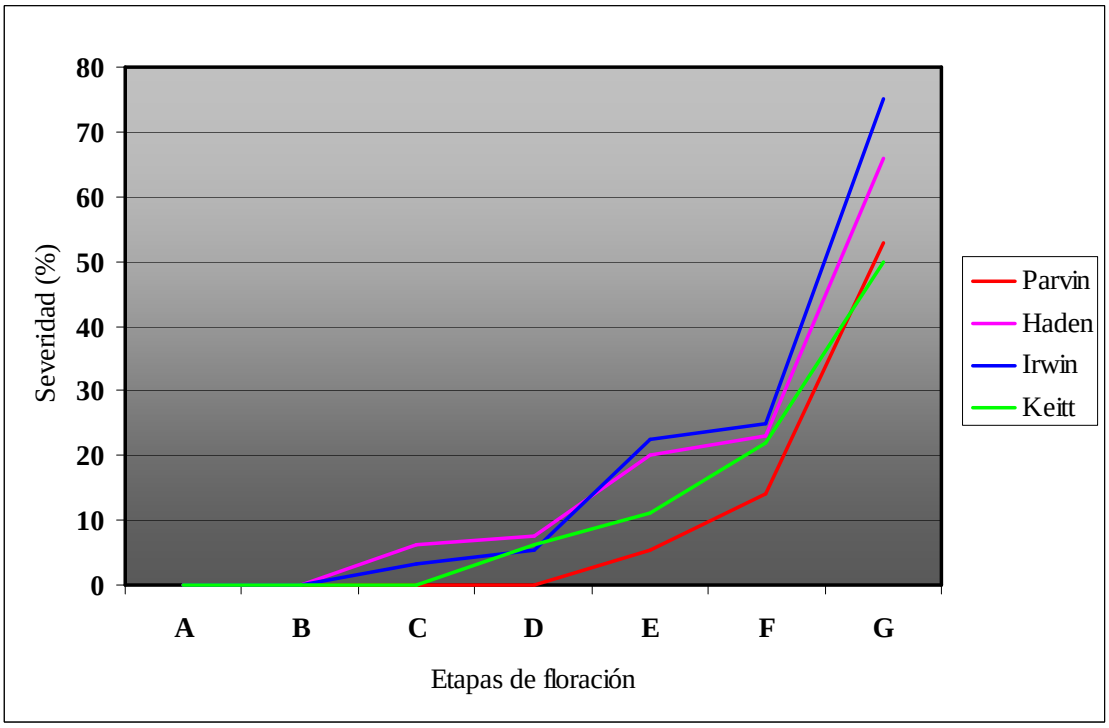

Figura 5. Porcentaje de severidad por etapas de floración en los cultivares de mango Parvin, Haden, Irwin y Keitt.

4.1.1. Añublo polvoriento: El añublo polvoriento se encontró afectando inflorescencias a partir de la etapa de floración coloreado verde (etapa D), presentándose en el 3.03% de las inflorescencias evaluadas en esa etapa. En las etapas de floración coloreado rojizo, coloreado rojizo abierto y flor completa (etapas E, F y G) se observó en el 25.8%, 17.0% y 51.16% de las inflorescencias evaluadas para cada etapa de floración respectivamente (Figura 6).

Figura 6. Inflorescencias mostrando síntomas de añublo polvoriento e inflorescencia sana. (A) inflorescencia asintomática, (B), (C) y (D) inflorescencias con añublo polvoriento en etapas de floración coloreado verde, coloreado rojizo abierto y flor completa respectivamente.

4.1.2. Necrosis: No se observó necrosis en las primeras etapas de la floración (A y B) en ninguno de los cuatro cultivares de mango evaluados. En la etapa de floración C, un 20 % de las inflorescencias evaluadas mostraron necrosis, en las etapas D, E, F y G la necrosis se observó en el 13.33, 35.48, 22.86 y 88.84% de las inflorescencias evaluadas respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de inflorescencias sintomáticas (necrosis) y asintomáticas por etapa de floración.

Etapa de floración	**Inflorescencias sintomáticas (%)**	**Inflorescencias asintomáticas (%)**
A	0.00	100.00
B	0.00	100.00
C	20.00	80.00
D	13.33	87.67
E	35.48	64.52
F	22.86	77.14
G	88.64	11.36

4.1.3. Quemazón de la inflorescencia: Para cada cultivar de mango, se analizaron inflorescencias que presentaron síntomas de quemazón y se obtuvo un total de 52 aislados de hongos perteneciente a los siguiente géneros: *Alternaria* spp., *Botryosphaeria*s spp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Gelasinospora* sp., *Phomopsis* spp. y *Pestalotiopsis* sp. Los géneros de hongos más comunes encontrados fueron *Botryosphaeria* spp. y *Phomopsis* spp.

4.2. Identificación de los hongos asociados a las inflorescencias de mango:

Además de los 52 aislados de hongos obtenidos de inflorescencias con síntomas de quemazón se obtuvieron 86 aislados de hongos de inflorescencias sintomáticas y asintomáticas del mango de los cultivares Keitt, Haden, Parvin e Irwin (Figura 10). Se identificaron diez géneros de hongos asociados a inflorescencias en los cultivares evaluados. Los géneros más frecuentemente aislados de las diferentes etapas de floración del mango fueron *Alternaria* spp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp. Los géneros más comunes asociados a la quemazón de la inflorescencia fueron: *Botryosphaeria* spp. y *Phomopsis* spp. La distribución de los géneros de hongo por cultivar de mango se muestra en la cuadro 5.

Cuadro 5. Distribución de los géneros de hongos encontrados por cada cultivar de mango.

		Cultivares de mango			
Organismo aislado	**Cantidad de aislados**	**Haden**	**Irwin**	**Parvin**	**Keitt**
Alternaria spp.	9	X	X		X
Botryosphaeria spp.	14	X	X	X	X
Colletotrichum sp.	6	X	X		X
Curvularia spp.	14	X	X		X
Fusarium spp.	9	X	X	X	X
Gelasinospora sp.	1	X			
Nigrospora spp.	2	X			X
Phoma sp.	1	X			
Phomopsis spp.	8	X	X	X	X
Pestalotiopsis sp.	2		X		X
No identificados	72	-	-	-	-

Cuadro 6. Cantidad de aislados por etapas de floración del mango.

Etapa de floración	Cantidad de aislados
A	5
B	6
C	6
D	14
E	13
F	15
G	27
Total	**86**

4.3. Características morfológicas y culturales de los hongos aislados

4.3.1. Morfología de *Alternaria alternata* (Fries) Keissler: Las conidias son producidas en conidióforos ramificados, son de forma ovoide, obclavada u obpiriforme, de paredes lisas o rugosas de 3 a 8 septos transversales y 1 a 2 septos longitudinales. Las conidias miden entre 21.54 a 43.28 µm de largo y 8.83 a 15.86 µm de ancho (Figura 7).

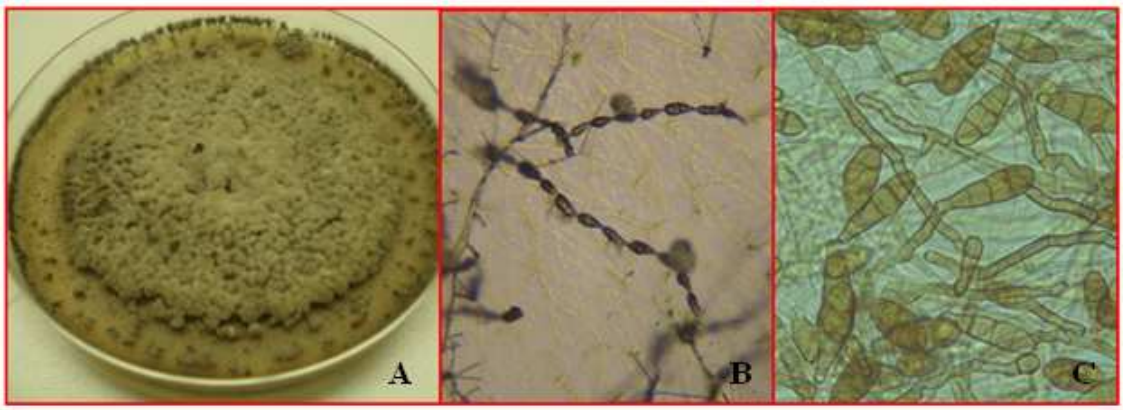

Figura 7. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler. A) colonia en medio de cultivo APDA, B) conidias producidas en cadena in situ y C) conidias.

4.3.2. Morfología de *Alternaria* spp. Las colonias de *Alternaria* sp. mostraron coloración blanca grisácea y marrón verdoso en medio de cultivo APDA. En medio de cultivo PCA presentan un crecimiento más lento y producen abundantes conidias. Los aislados de *Alternaria* sp. H – 172 E (18/01), I – 142 F (17-02), I – 140 F (17/02) y K – 283 E (02/03) producen conidias en cadenas (Figura 8).

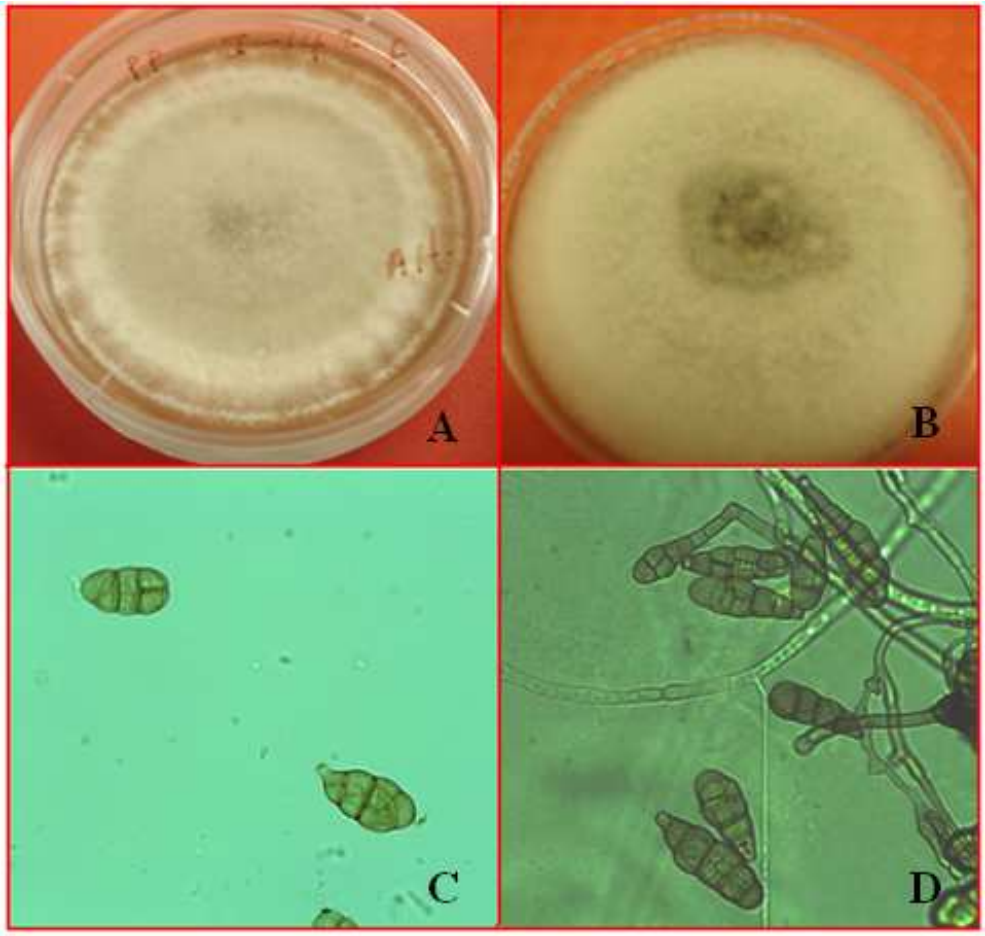

Figura 8. *Alternaria* sp. (A y B) colonias en medio de cultivo APDA, (C y D) conidias.

4.3.3. Morfología de *Botryosphaeria rhodina* Berk. & M.A. Curtis: Se obtuvieron dos aislados de *B. rhodina.* Estos presentaron colonias de color inicialmente blanco, que cambia a color negro verdoso con micelio aéreo en medio de cultivo APDA. Las conidias son inicialmente hialinas, aseptadas, de forma redondeada en el ápice y truncada en la base, de paredes gruesas y luego se tornan de color marrón oscuro, presentando un septo transversal y estrías longitudinales al madurar. Las conidias midieron entre 21.66 a 26.78 µm de largo y 10.06 a 14.81 µm de ancho (Figura 9).

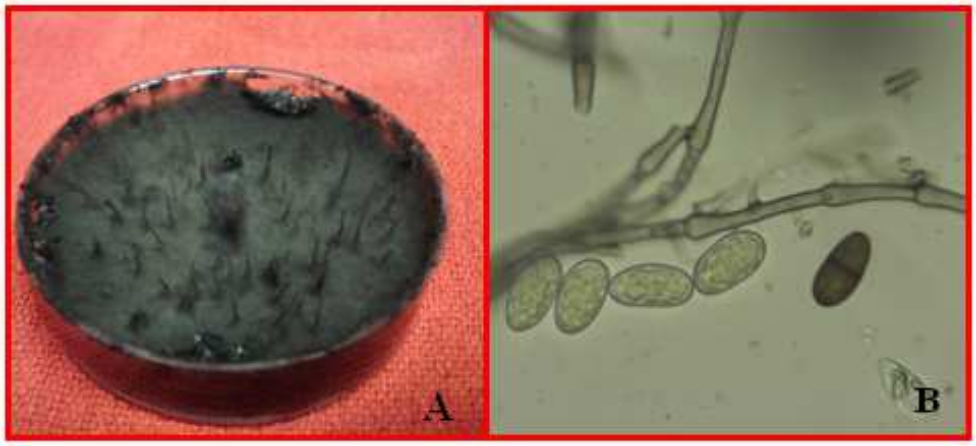

Figura 9. *Botryosphaeria rhodina* (anamorfo = *Lasiodiplodia theobromae*). A) Colonia en medio de cultivo APDA, B) conidia madura (oscura) y conidias inmaduras.

4.3.4. Morfología de *Botryosphaeria parva* Pennycook y Samuels: Se obtuvieron 11 aislados *B. parva* en su estado anamorfo *Neofusicoccum parvum* provenientes de inflorescencias de mango con síntomas de quemazón. En medio de cultivo APDA, las colonias crecen inicialmente de color blanco, y luego se tornan a negro pálido con micelio aéreo. Las conidias son hialinas, aseptadas, elipsoides a fusoides y midieron entre 10.07 a 16.30 µm de largo y 4.0 a 7.22 µm de ancho(Figura 10).

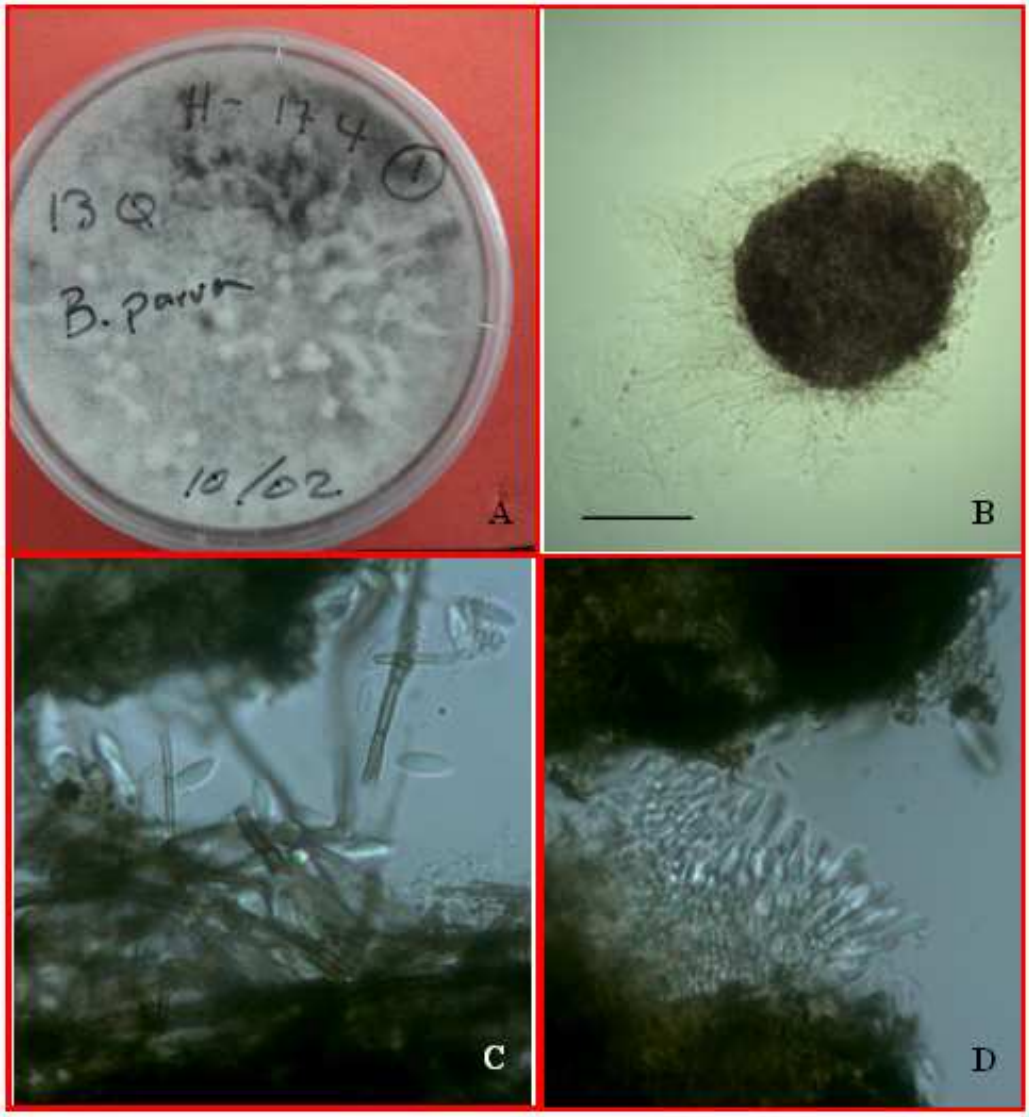

Figura 10. *Botryosphaeria parva* (anamorfo = *Neofusicoccum parvum*) A) colonia en medio de cultivo APDA, B) picnidio (barra = 30 µm), c) conidias y D) células conidiógenas.

4.3.5. Morfología de *Botryosphaeria ribis* Grossenb. y Duggar: Se obtuvieron dos aislados de *B. ribis* en su fase asexual *Neofusicoccum ribis* (Grossenb. & Dugg.) Crous, Slippers & AJL Phillips. En medio de cultivo APDA, las colonias de *B. ribis* son inicialmente blancas y luego cambian a gris oliváceo con micelio aéreo. Las conidias son

hialinas, aseptadas, fusiformes, truncadas en la base y midieron entre 20.2 a 27.5 µm de largo y 4.3 a 6.51 µm de ancho (Figura 11). Esta especie tiende a ser confundida con *B. parva* y *B. dthidea* debido a que la morfología de la conidia es similar, aunque las conidias de *B. dothidea* son ligeramente mas grandes (20 a 29 µm) y *B. parva* y *B. ribis* pueden producir 1 a dos septos al madurar.

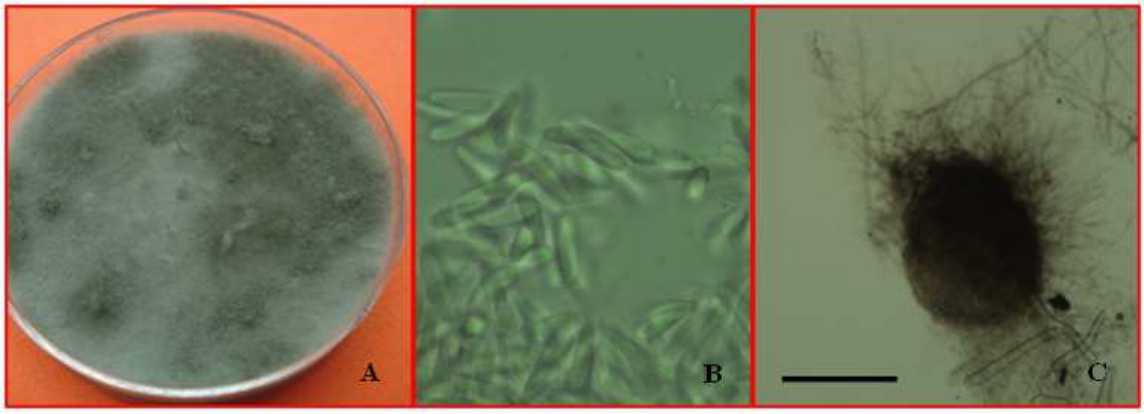

Figura 11. *Botryosphaeria ribis* (Grossenb y Duggar). A) colonia en medio de cultivo APDA, B) conidias y C) picnidio inmaduro. Barra = 35 µm.

4.3.6. Morfología de *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld y H. Schrenk: Se obtuvieron seis aislados de *Glomerella* en su fase asexual *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. Se observaron algunas diferencias en la coloración de las colonias en el medio de cultivo APDA y en el tamaño de las conidias. Se observaron colonias blancuzcas con micelio algodonoso y otras colonias grisáceas. Para el aislado H-172 G (20-04) se observó la fase sexual (*Glomerella cingulata*) en medio de cultivo APDA. Este aislado produce peritecios obpiriformes a subglobosos. Las ascas son unitunicadas, cilíndricas a ligeramente clavadas o elipsoides y pueden contener 4, 6 y 8 ascosporas. Las ascosporas son unicelulares, hialinas, biseriadas en el asca, elipsoides, subcilíndricas o

curvadas y miden entre 13.36 a 14.80 µm de largo y 2.79 a 4.50 µm de ancho (Figura 12).

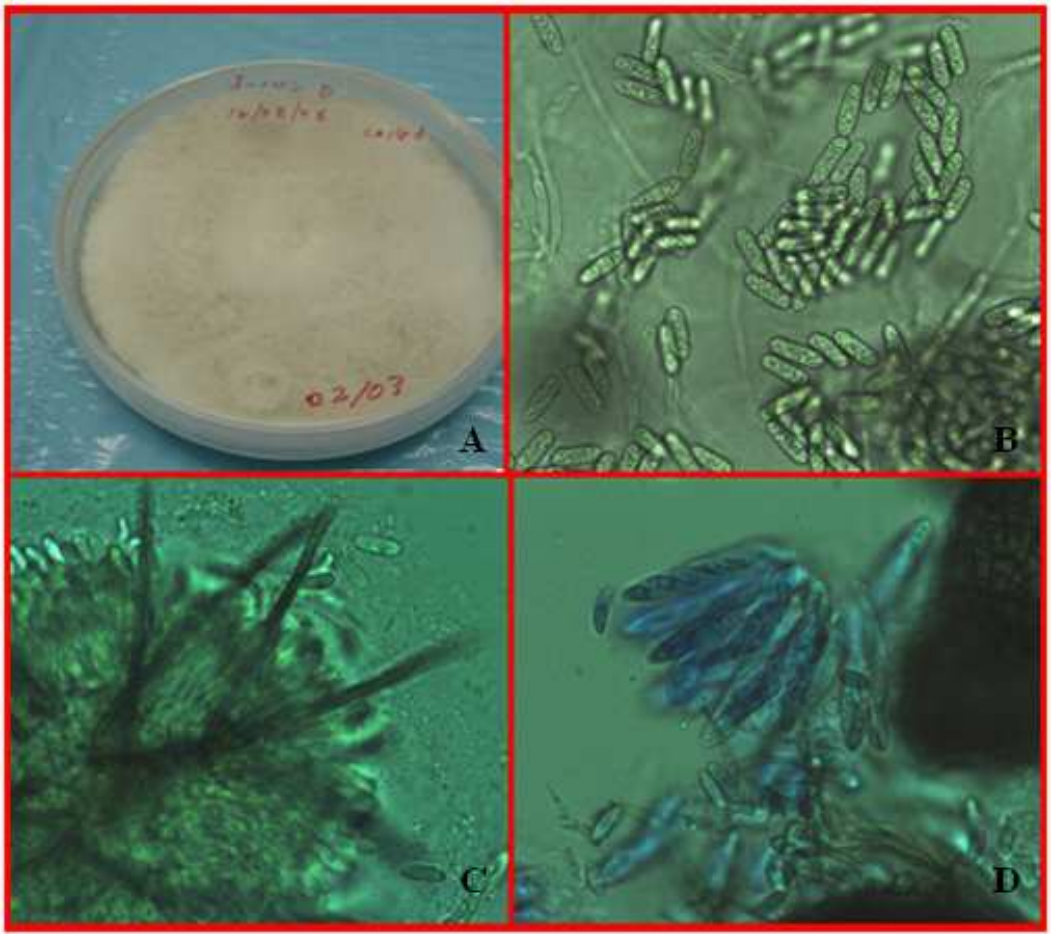

Figura 12. *Glomerella cingulata* (anamorfo = *Colletotrichum gloeosporioides).* A) colonia en medio de cultivo APDA, B) conidias, C) setas y D) ascas con ascosporas.

4.3.7. Morfología de *Giberella intricas* Wollenw: Se observó la fase anamorfa *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. En medio de cultivo APDA no se observaron microconidias de *F. equiseti*. Las macroconidias son hialinas, de 3 a 5 septos, producidas en fiálidos simples laterales y miden entre 26.64 a 36.07 µm de largo y 1.90 a 3.45 µm de ancho (Figura 13) (Booth, 1971; Leslie y Summerell, 2006).

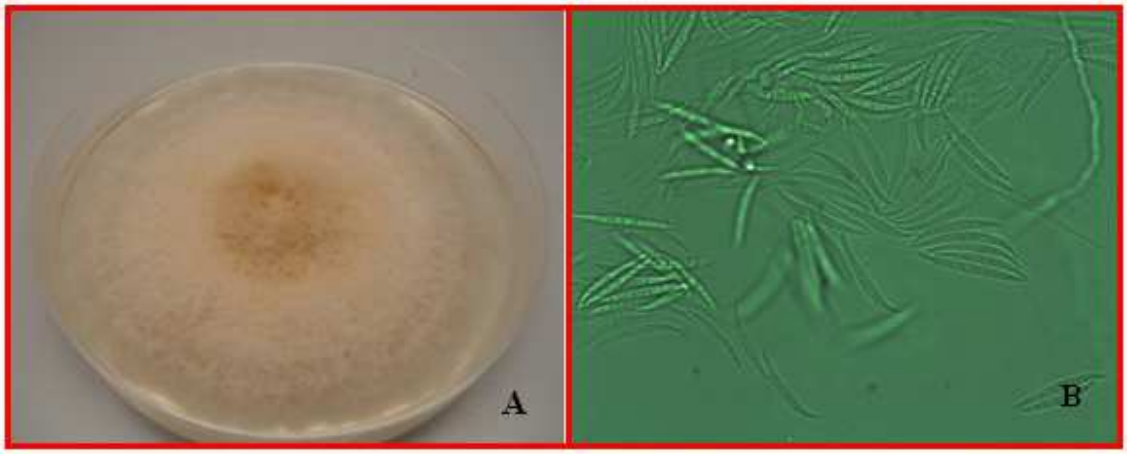

Figura 13. *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. A) Colonia en medio de cultivo APDA y B) macroconidias.

4.3.8. Morfología de *Fusarium solani* (Mart) Appel y Wollenweber enmend. Snyder y Hansen: En medio de cultivo APDA presenta un crecimiento moderadamente rápido, produce colonias de color blanco amarillento y esporula abundantemente en 7 a 14 días. Las macroconidias son producidas en conidióforos ramificados, poseen de 3 a septos y miden entre 27.34 a 42 µm de largo y 3.62 a 6.02 µm de ancho (Figura 14). En medio de cultivo CLA las macroconidias son producidas en monofialiodos relativamente largos sobre el micelio aéreo. Las microconidias presentan de 0 a 3 septos con puntas redondeadas.

4.3.9. Morfología de *Haematonectria haematococca* (Berk. y Broome) Samuels y Nirenberg: Se obtuvo un aislado del hongo *Fusarium solani* que desarrolló su fase sexual en medio de cultivo CLA. Los peritecios se produjeron solitarios en medio de cultivo CLA. Las ascas son unitunicadas, cilíndricas a obpiriformes y octosporadas con una longitud de entre 57.09 a 63.08 µm. Las ascosporas son hialinas y bicelulares (Booth, 1971) (Figura 14).

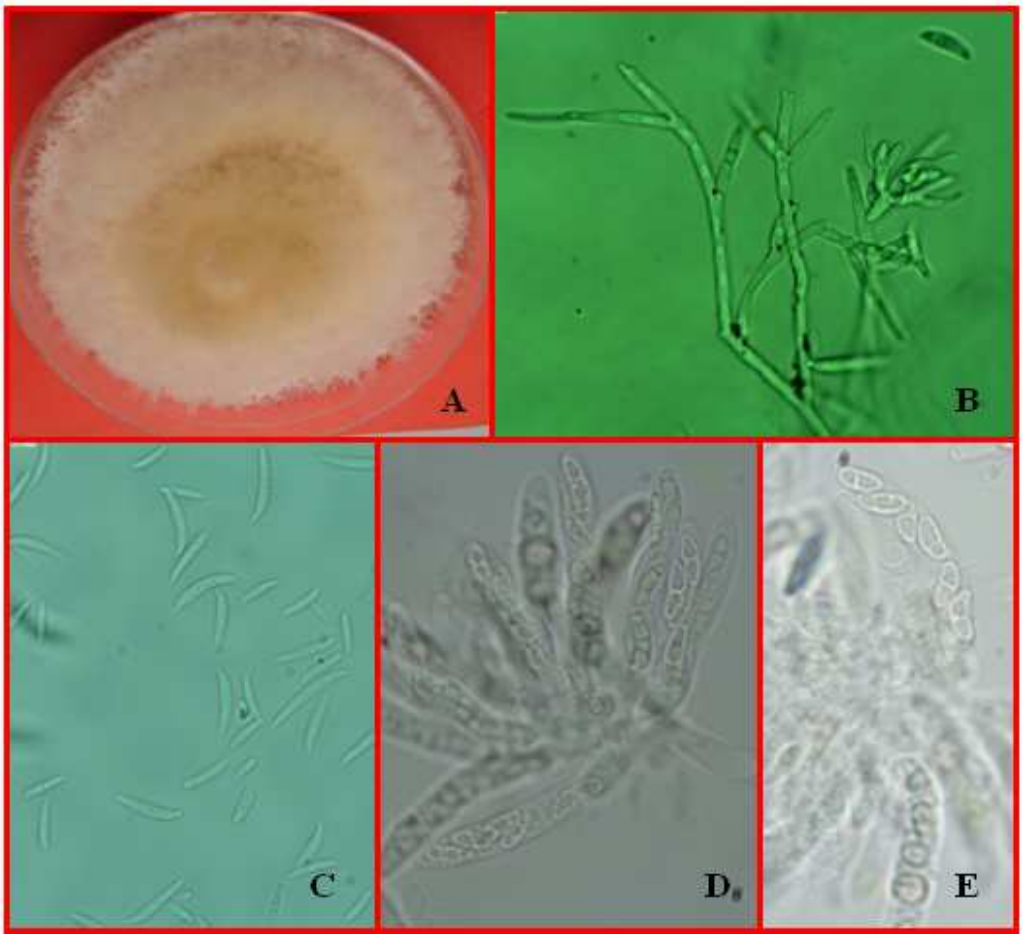

Figura 14. *Haematonectria haematococca* teleomorfo de *Fusarium solani* Mart. A) colonia en medio de cultivo APDA, B) macroconidioforo, C) macroconidias, D y E) ascas con ascosporas

4.3.10. Morfología de *Fusarium oxysporum* (Schlcht.) Snyder y Hansen: Se obtuvo un asilado de *F. oxysporum*. Produce colonias inicialmente blancas, que luego de 2 a 3 días se tornan de color púrpura, tanto en medio de cultivo APDA como en CLA. El crecimiento es lento (1.3 mm a 30 ºC a los 3 días) en medio de cultivo APDA y produce abundantes macroconidias (Figura 15). Las macroconidias tienen generalmente de 1 a 3 septos y son producidas en monofiálidos sobre conidióforos ramificados en esporodoquios. Para este aislado no se observaron clamidosporas y las microconidias se encontraron dispersas en los medios de cultivo APDA y CLA.

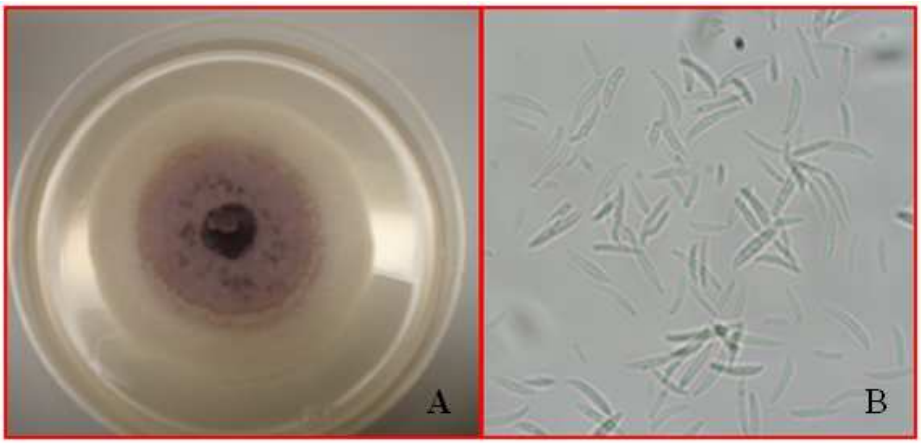

Figura 15. *Fusarium oxysporum* (Schlcht.) Snyder & Hansen. A) colonia en medio de cultivo APDA y B) macroconidias.

4.3.11. Morfología de *Albonectria rigidiuscula* (Berkely y Brick) Rossman y Samuels: Se obtuvieron 4 aislados de *Albonectria rigidiuscula* en su fase asexual (*Fusarium decemcellulare* Brick). Este ascomiceto produce colonias inicialmente blancuzcas a amarillentas, que luego se tornan rojizas en medio de cultivo APDA. El hongo esporula formando esporodoquios de color amarillo con apariencia viscosa y produce macroconidias grandes que miden entre 60.81 a 76.04 µm de largo y 5.11 a 6.90 µm de

ancho, ligeramente curvadas con 3 - 6 septos. Las microconidias son producidas en falsas cabezas y en cadenas, miden entre 7.41 a 12.93 µm de largo y 2.03 a 4.77 µm de ancho. No se observaron clamidosporas (Figura 16).

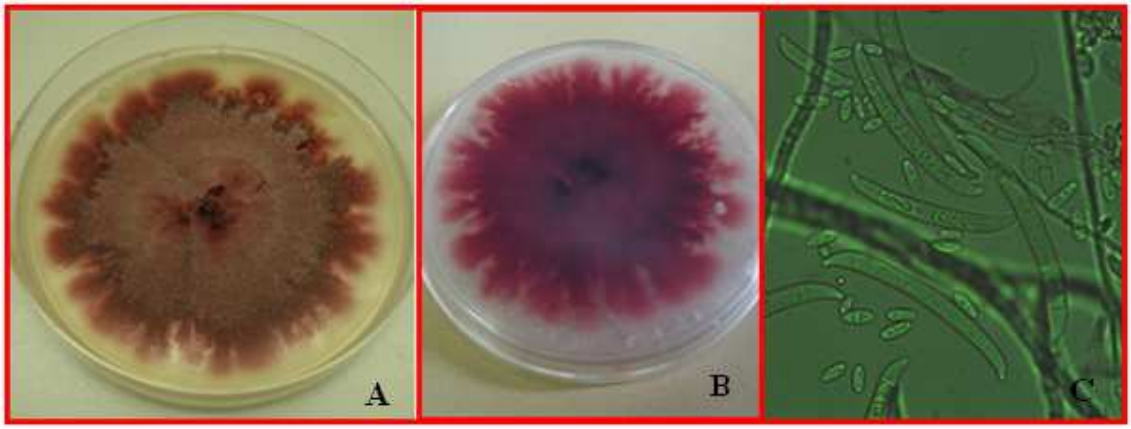

Figura 16. *Albonectria rigidiuscula* (Berkely & Brick) Rossman y Samuels en su fase asexual (*Fusarium decemcellulare*). A) colonia de color rosado intenso en medio de cultivo APDA, B) reverso de colonia y C) macro y microconidias.

4.3.12. Morfología de *Cochliobolus lunatus R.R. Nelson & F.A. Haasis*: *Cocchliobolus lunatus* [anamorfo = *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn] produce colonias de color verdoso a negro pálido en medio de cultivo APDA. Las conidias miden entre 14.70 a 19.66 µm de largo y 5.76 a 11.06 µm de ancho, son pigmentadas, septadas y producidas en conidióforos erectos (Figura 17).

Figura 17. *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. A) Colonia en APDA y B) conidióforo y conidias.

4.3.14. Morfología de *Gelasinospora* sp. Dowding: La colonia en medio de cultivo APDA está parcialmente inmersa en el medio y es de color blanco. El hongo produce abundantes ascocarpos (peritecios) ostiolados, solitarios y agrupados de color marrón oscuro a negros en medio de cultivo APDA. Las ascas son cilíndricas y octosporadas. Las ascosporas son de color marrón oscuro a negro, uniseriadas en las ascas y presentan un ornamento con apariencia de pequeñas celdillas (Figura 18).

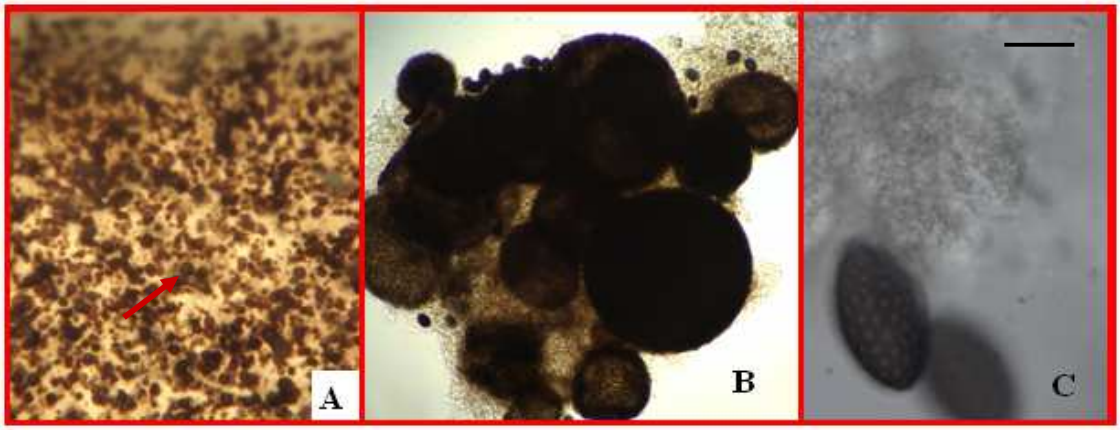

Figura 18. *Gelasinospora* sp. A) peritecios in situ en medio de cultivo APDA B), peritecios y C) Ascosporas.

4.3.15. Morfología de *Pestalotiopsis mangiferae* (Henn.) Steyaert: Se obtuvieron dos aislados de *Pestalotiopsis mangiferae*. Este produce colonias blancas y esporula abundantemente en medio de cultivo APDA. Las conidias son producidas en acérvulos de color negro, tienen cuatro septos. Las tres células centrales de las conidias son pigmentadas y dos hialinas, una en cada extremo de la misma, la célula basal presenta dos apéndices de 11.90 a 16.33 µm de largo y la célula apical presenta un apéndice de 6.24 a 8.99 µm de largo. Las conidias miden entre 20.81 a 27.53 µm de largo y 4.15 a 6.45 µm de ancho (Figura 19).

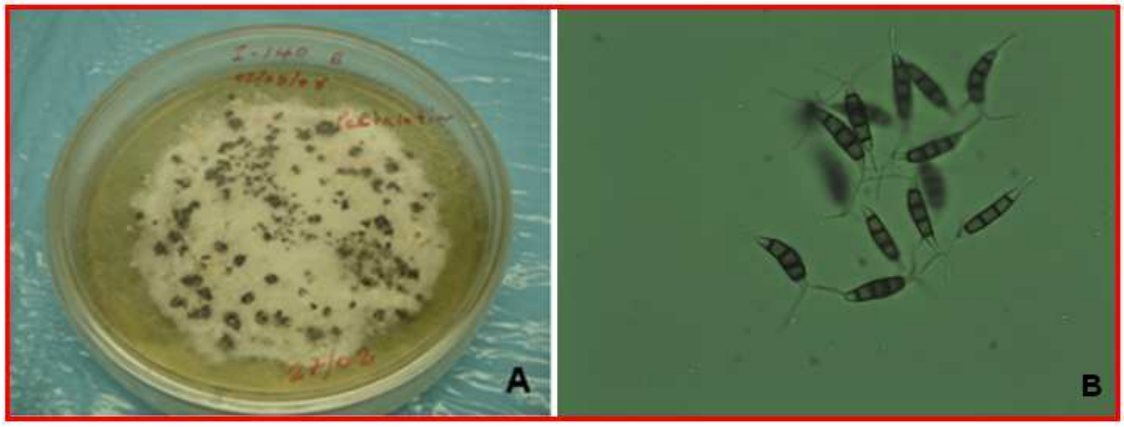

Figura 19. *Pestalotiopsis mangiferae*. A) colonia en medio de cultivo APDA y B) conidias.

4.3.16. Morfología de *Didymella exigua* (Niessl) Sacc: Se obtuvo un aislado de *Didymella exigua* en su estado anamorfo *Phoma exigua* Desm. La colonia en medio de cultivo APDA es de color inicialmente blanco a grisáceo, que luego se torna verdosa. El hongo produce abundantes picnidios semi – inmersos en el medio de cultivo, solitarios o agrupados, globosos o subglobosos irregulares y de color marrón oscuros a negros. Produce una matriz de conidias blancas a amarillas alrededor de los picnidios. Las

conidias son hialinas, algunas presentan un septo y miden entre 4.08 a 6.96 µm de largo y 1.63 a 2.50 µm de ancho. Los picnidios son redondeados, de color marrón, con un diámetro promedio de 107.43 µm (Figura 20). Este aislado fue identificado por el Dr. Maikel M. Avescamp (Fungal Biodiversity Centre, Holanda).

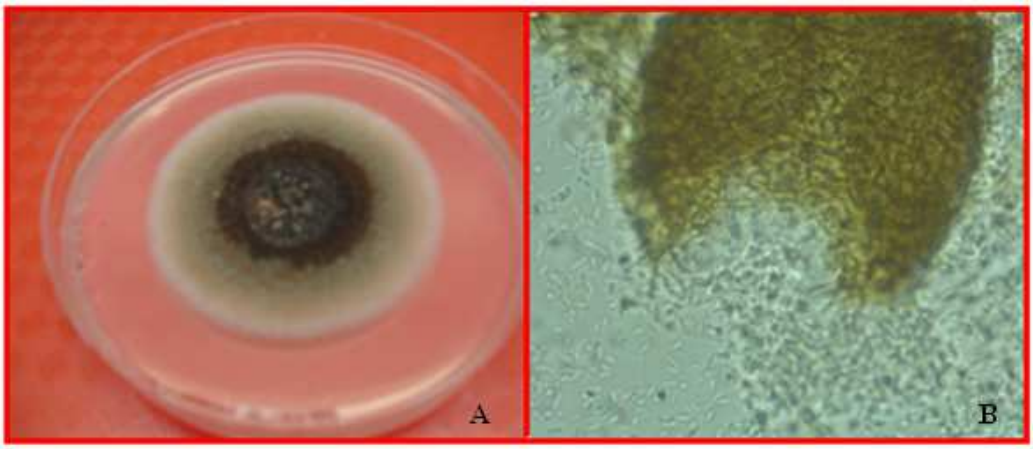

Figura 20. *Dydimella exigua* (anamorfo = *Phoma exigua*). A) picnidio y conidias y B) colonia en medio de cultivo APDA.

4.3.17. Morfología de *Phomopsis longicolla* Hobbs: En medio de cultivo APDA produce colonias con micelio denso de color blanco y abundantes cuerpos duros (picnidios) de color negro, los cuales producen un exudado de color crema que corresponde a las alfa-conidias. Las alfa-conidias son hialinas, elipsoides a fusiformes y miden entre 5.45 a 7.95 y 1.16 a 2.0 µm. Las beta-conidias son hialinas y filiformes, con una longitud entre 22.72 a 32.56 µm (Figura 21).

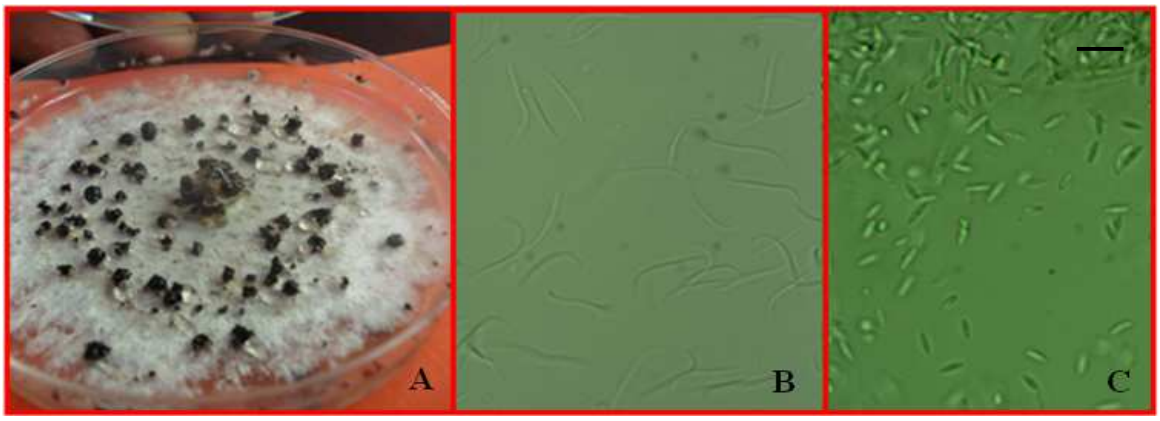

Figura 21. *Phomopsis longicolla* Hobbs. A) colonia en medio de cultivo APDA B) conidias beta (β-conidias) y C) conidias alfa (α-conidias).

4.3.18. Morfología de *Phomopsis* sp. Punith: En medio de cultivo APDA producen colonias de color blanco y los picnidios de color negro. No se observaron conidias alfa. Las conidias beta son hialinas y filiformes, con una longitud entre 22.72 a 32.56 µm (Figura 22).

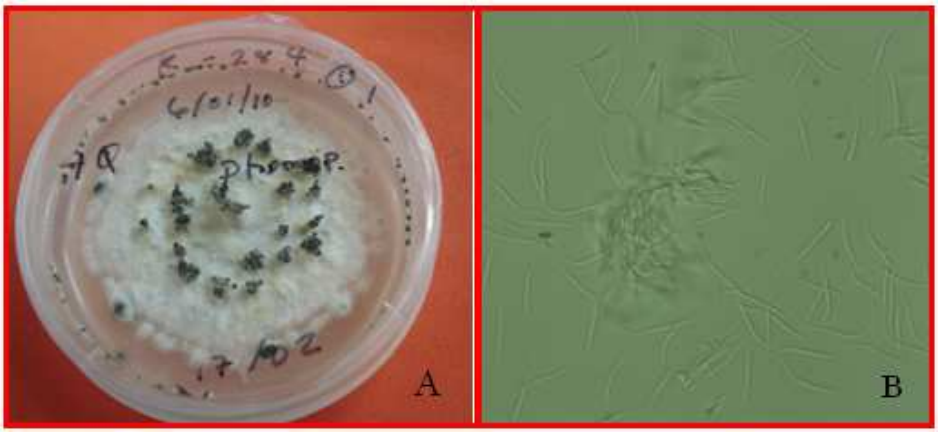

Figura 22. *Phomopsis* sp. A) colonia en medio de cultivo APDA y b) conidias beta.

4.4. Identificación molecular

Se identificaron molecularmente 45 aislados de hongos mediante la amplificación y secuenciación de la región espaciadora de transcripción interna de ADN ribosomal (ITS del rADN). Los aislados de *Colletotrichum* fueron identificados como *C. gloeosporioides* utilizando los iniciadores específicos *Cg*Int y *Ca*Int para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* respectivamente. Esta última especie no se encontró durante este estudio. Las secuencias de nucleótidos para cada aislado se introdujeron el GenBank. Las especies identificadas mediante análisis de ADN se presentan en la Cuadro 2.

4.5. Pruebas de patogenicidad

El 82 % de los aislados evaluados causaron síntomas en las inflorescencias de mango en los cultivares Irwin y Haden durante las pruebas de patogenicidad. Las dos especies de *Botryosphaeria* utilizadas en dichas pruebas, *B. rhodina* y *B. parva* resultaron patogénicas a las inflorescencias del mango. *B. rhodina* (anamorfo = *Lasodiplodia theobromae*) resultó más virulenta, observándose la quemazón de la inflorescencia a los 5 días después de la inoculación. La especie *B. parva* causó necrosis en el raquis, sin embargo, no se observó quemazón. *Colletotrichum gloeosporioides,* aislados I-141G (20/12) y H-172G (20/04) causaron necrosis en los pétalos y manchas necróticas en el raquis y florecillas. *Phomopsis* sp. aislado P- 49 A2 produjo lesiones necróticas color negro y formas irregulares en el raquis de las inflorescencias en los tratamientos con

heridas. *Alternaria alternata* aislados K – 283 G (04-04) y K – 282 - 4 produjeron manchas necróticas elipsoidales en las inflorescencias de mango en los tratamientos con heridas, sin embargo, no produjeron ningún síntoma en los tratamientos sin heridas. *Phoma exigua* aislado H – 172 G (17/02) y *Albonectria rigidiuscula* aislado H – 172 (1) 19/01 no produjeron ningún tipo de síntoma en las inflorescencias de mango en las condiciones evaluadas.

4.5.1. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler.: *A. alternata* produjo manchas necróticas de forma elíptica a irregulares en el raquis de la inflorescencia en los tratamientos con heridas (Figura 23).

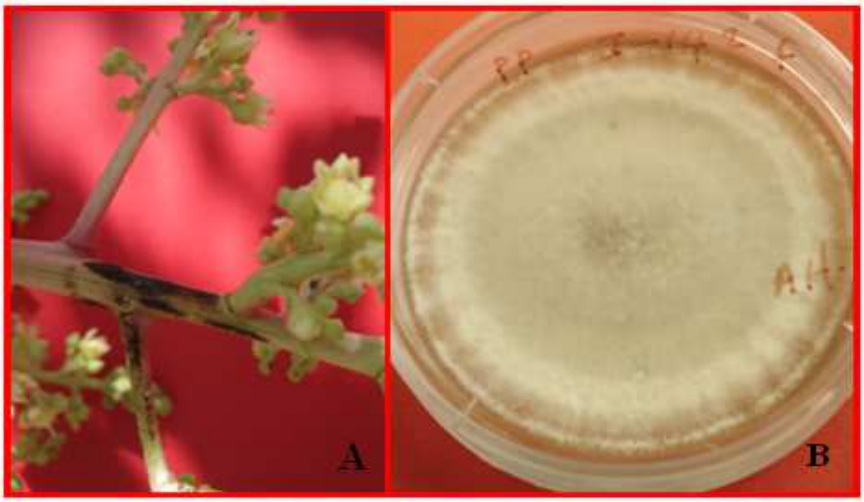

Figura 23. Manchas necróticas elípticas causadas por *Alternaria alternata* en inflorescencias del mango. A) sintomatología producida en cv. Haden y B) colonia en medio de cultivo APDA.

4.5.2 *Botryosphaeria rhodina*: *Botryosphaeria rhodina* (anamorfo = *Lasiodiplodia theobromae*) causó quemazón de las inflorescencias del mango en el cultivar Haden (Figura 24). El hongo penetra por heridas y provoca la quemazón de la inflorescencia, observándose una reducción del tamaño de la misma. En tratamientos sin heridas no causó ningún síntoma.

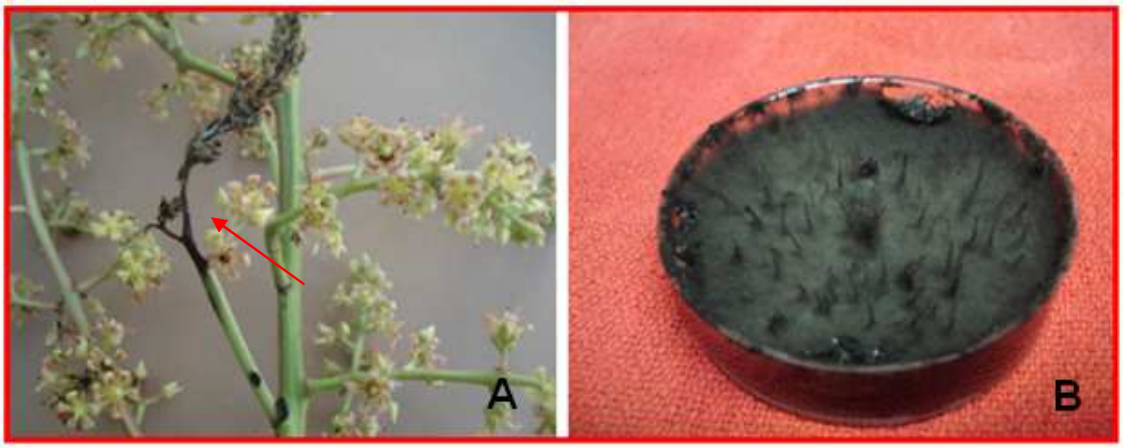

Figura 24. Quemazón causada por *Botryosphaeria rhodina* en inflorescencia de mango. A) síntomas en cv. Haden y B) colonia en medio de cultivo APDA.

4.5.3. *Botryosphaeria parva*: El aislado H – 174 (1) 13Q de *Botryosphaeria parva* produjo lesiones necróticas sobre el raquis de 2.5 cm a los 8 días después de la inoculación cuando se realizaron heridas al tejido. No se observaron síntomas de quemazón (Figura 25).

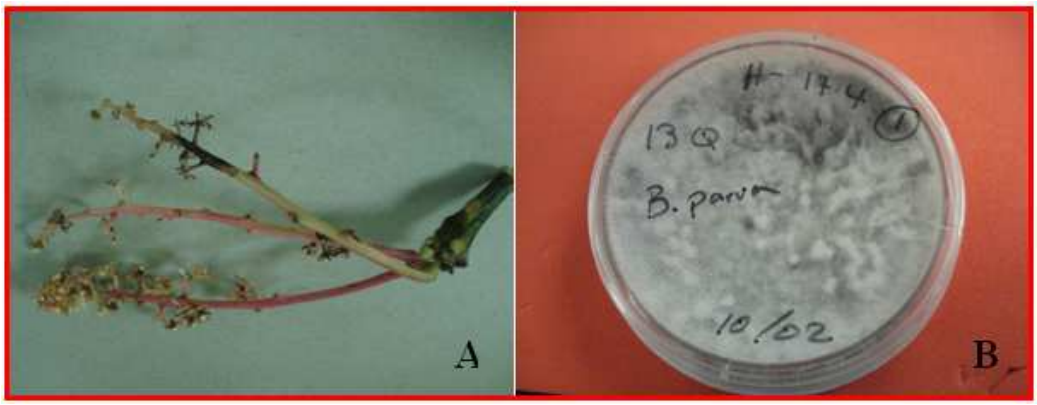

Figura 25. Necrosis causada por *Botryosphaeria parva* en inflorescencia del mango. A) lesión en raquis y B) colonia en medio de cultivo APDA.

4.5.4. *Colletotrichum gloeosporioides*: Se comprobó la patogenicidad de dos aislados del hongo *C. gloeosporioides* en inflorescencias del mango en los cultivares Irwin y Haden. El hongo causa necrosis en el raquis y en las flores individuales (Figura 26).

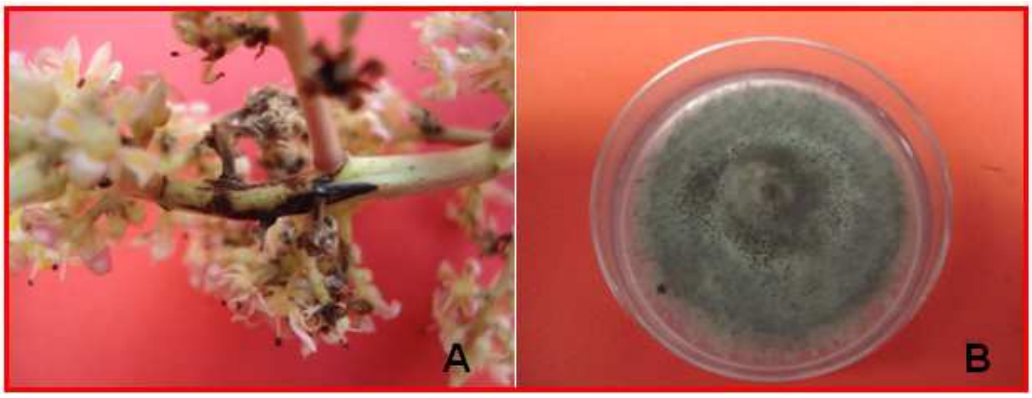

Figura 26. Necrosis del raquis y de las flores causada por *Colletotrichum gloeosporioides* A) sintomatología observada en el cv. Haden y B) colonia en medio de cultivo APDA.

4.5.5. *Phomopsis* sp.: Se comprobó la patogenicidad de *Phomopsis* sp. aislado K – 284 (1) 1. Este causó lesiones necróticas irregulares en el raquis de las inflorescencias del mango en etapa F de floración (Figura 27).

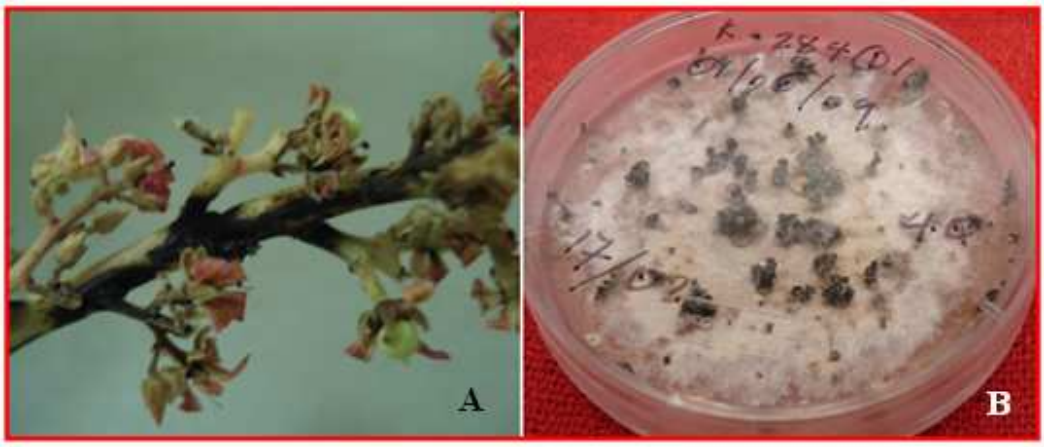

Figura 27. Lesiones necróticas en el raquis de las inflorescencias del mango causadas por *Phomposis* sp. A) sintomatología en cv. Haden y B) colonia en medio de cultivo APDA.

5. DISCUSIÓN

Las inflorescencias del mango están afectadas por una gran cantidad de hongos que pueden colonizar las diferentes partes de la misma, ya sea como patógenos o como endofitos. En este estudio se identificaron varios géneros de hongos que han sido reportados como patogénicos en inflorescencias de mango y otros que han sido hallados endofíticamente. Entre los hongos patógenos identificados están: *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *Botryosphaeria parva* y *Fusarium* sp. Entre los endofitos están *Pestalotiopsis* sp., *C. gloeosporioides, A. alternata, F. decemcellulare, L. theobromae* y *Phomopsis sp*. Estudios realizados en Venezuela indican que la colonización endofítica puede considerarse como una ruta importante para el desarrollo de enfermedades en el mango, debido a que muchos hongos fitopatógenos también ocurren como endofitos en sus órganos reproductivos. Entre estos hongos se mencionan *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *Cladosporium* sp., *F. decemcellulare* y *L. theobromae* (Morales y Rodríguez, 2006).

Durante este estudio, se aisló *Neofusicoccum parvum* (teleomorfo = *Botryosphaeria parva*) asociado al tizón o quemazón de la inflorescencia con alta frecuencia (25%). Esto se compara con el estudio realizado por Slippers et al. (2005) y Johnson et al. (1992) quienes demostraron que el hongo *Botryosphaeria parva* (anamorfo = *Neofusicoccum parvum*) es el patógeno más común causante de tizón o quemazón en inflorescencias del mango en Australia y Nueva Zelanda.

En los cultivares de mango evaluados durante esta investigación en la Subestación Juana Díaz no se observaron síntomas de enfermedad en las etapas A y B de la floración. Según Schoeman y Manicom (1995), las etapas de floración A y B no son susceptibles al añublo polvoriento. Esto parece indicar cierto grado de resistencia a las enfermedades cuando están en estas etapas como ocurre en las frutas inmaduras, que poseen compuestos antifúngicos (5-12 - cic – heptadecenyl resorcinol y 5- pentadecenyl resorcinol) que representan barreras químicas potenciales contra los patógenos (Prusky y Keen, 1993).

La necrosis en inflorescencias de mango se observó a partir de la etapa de floración C (estado protegido). De estas inflorescencias se aislaron los siguientes hongos: *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *Curvularia* spp., *Phoma exigua*, *Phomopsis* spp, y *Fusarium* spp. A nivel mundial se reportan *C. gloeosporioides* y *A. alternata* como causantes de necrosis en inflorescencias del mango (Ploetz, 2003), lo cual se compara con este estudio, donde se encontraron *A. alternata*, *B. parva*, *C. gloeosporioides* y *Phomopsis* sp. causando necrosis en tejidos florales del mango en el cultivar Haden.

El añublo polvoriento causado por *O. mangiferae* afectó las inflorescencias del mango, principalmente en etapas maduras de la floración en los cultivares Haden, Irwin, Keitt y Parvin, colonizando superficialmente todas las partes de la inflorescencia. Este hongo es un parásito obligado que crece sobre los tejidos causando la caída de las flores y necrosis en toda la inflorescencia. Los primeros síntomas de la enfermedad añublo polvoriento se observaron a partir de la etapa de floración conocida como coloreado

verde (etapa D) en el cultivar Irwin, siendo la etapa de flor completa (etapa G) la más afectada. Estos hallazgos son similares a los reportados por Schoeman y Manicom (1995) durante un estudio de epidemiología del añublo polvoriento. Estos autores observaron la aparición de los primeros síntomas de esta enfermedad entre las dos y las tres semanas después que el 20% de las inflorescencias alcanzaron el estado de floración coloreado rojo o coloreado rojo abierto (etapas de floración E y F), siendo más severos en etapas maduras de floración. Las etapas de floración del mango susceptibles a la infección por *O. mangiferae* comprenden desde el estado protegido (etapa C) hasta la etapa de floración completa (etapa G). Esto hallazgos son similares a los reportados por Nelson (2008), quien encontró que la etapa de floración completa es la más susceptibilidad a la infección por *O. mangiferae.*

Las condiciones climáticas del área Sur Oeste e la Isla como la EEA de Juana Díaz son propicias para el desarrollo del añublo polvoriento, con temperatura promedio entre 21.1 a 27.8ºC, precipitación promedio anual de 1143 milímetros y humedad relativa entre 60 hasta 85%. En cuanto a las condiciones climáticas para el desarrollo del añublo polvoriento, el hongo *O. mangiferae* puede causar infección con temperaturas de 15 hasta 32˚C y humedad relativa de 15.5 hasta 100%, siendo la temperatura atmosférica el factor más importante para el inicio y desarrollo epidémico de la enfermedad bajo condiciones de campo.

Las pruebas de patogenicidad mostraron que el 82% de los aislados evaluados son patógenos a las inflorescencias del mango. Los aislados de *Botryosphaeria* evaluados

causaron quemazón de la inflorescencia (*B. rhodina*) y necrosis en las florecillas y el raquis (*B. parva*). La patogenicidad de la especie *B. ribis* no se evaluó. Según Slippers et al., *B. ribis* es de poca importancia como patógeno del mango y posiblemente actúa como endofito. El hongo *Alternaria alternata* causó manchas necróticas elípticas en el raquis de las inflorescencias en los tratamientos con heridas y *C. gloeosporioides* causó manchas necróticas irregulares en florecillas y raquis en tratamientos con y sin heridas. Los hongos *Phoma exigua* aislado H - 172 G 17/02 y *Albonectria rigidiuscula* aislado H – 172 (1) 19/01 evaluados no causaron ningún síntoma.

En este estudio se identificaron 8 aislados de *Fusarium*, pero no se observó tejido malformado en los árboles evaluados. La malformación de la inflorescencia del mango no ha sido reportada en Puerto Rico. *Fusarium* sp. probablemente actúa como endofítico en las inflorescencias del mango en los cultivares evaluados y bajo las condiciones climáticas de la zona de estudio.

6. CONCLUSIONES

- La sintomatología de las enfermedades de la inflorescencia del mango en los cultivares evaluados durante esta investigación (Haden, Irwin, Parvin y Keitt) comprende: manchas necróticas de forma elipsoidal y color negro en el raquis de la inflorescencia, manchas negras de forma irregular en raquis, añublo polvoriento colonizando la totalidad de las flores individuales y parte del raquis secundario y tizón o quemazón de inflorescencias.

- No se observaron inflorescencias malformadas en ninguno de los cultivares evaluados.

- El añublo polvoriento es el síntoma más común que afecta las inflorescencias del mango a partir de la etapa de floración conocida como coloreado verde (etapa E), siendo más frecuente en etapas maduras de la floración.

- La severidad de los síntomas no fue significativamente diferente entre los cultivares en ninguna de las etapas de floración del mango.

- Entre los hongos más frecuentemente aislados están: *Alternaria* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia* spp., *Phomopsis* spp., *Fusarium* spp., y *Botryosphaeria* spp., de estos, *Botryosphaeria* spp., *Phomopsis* spp. y *Fusarium* spp. se encontraron en los cuatro cultivares evaluados.

- Los hongos *Botryosphaeria rhodina*, *B. ribis*, *B. parva*, y *Phomopsis* sp. fueron los más frecuentemente aislados de inflorescencias que mostraban síntomas de quemazón.

- *Botryosphaeria rhodina* es causante de quemazón en inflorescencias del mango en los cultivares Irwin y Haden, mientras que *B. parva* causa necrosis en tejidos de mango. Ambas especies penetran por heridas.

- Las especies *Phoma exigua* y *Albonectria rigidiuscula* no fueron patogénicas a las inflorescencias del mango.

- La mayoría de los hongos asociados a las inflorescencias del mango en los cultivares estudiados ocurren como endofitos, siendo aislados mayormente de inflorescencias asintomáticas.

7. RECOMENDACIONES

1. Realizar muestreos en los cultivares de mango en siembras comerciales de la zona sur de Puerto Rico para estudiar las enfermedades que afectan las inflorescencias del mango en dichas siembras.

2. Evaluar la patogenicidad de otros aislados de *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. y *Phomopsis* sp. no evaluados en este estudio, ya que fueron obtenidos con alta frecuencia y solo se probaron algunos aislados.

3. Caracterizar molecularmente los hongos utilizando múltiples regiones genómicas para determinar variabilidad genética de los principales hongos fitopatógenos encontrados en este estudio. Entre los genes a utilizar se pueden citar al factor de alargamiento (ef), beta-tubulina (Bt), y los espaciadores interngenicos (IGS). Además, utilizar iniciadores específicos disponibles para amplificar dichas regiones genómicas.

8. LITERATURA CITADA

Akem, C. N. 2006. Mango anthracnose disease. Present status and future research priorities. *Plant Pathology Journal* 5: 266-273

Alves, A., P. W. Crous., A. Correia., A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1-13.

Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84: 600 - 611.

Bally, I. S. 2006. *Mangifera indica* L. (mango). Species profiles for pacific island agroforestry. www.traditionaltree.org. (consultado en Julio-1-2010).

Bailey, J. A., M. J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. *CAB International*. Wallingford, UK. 402 pp.

Barnett, H. L., B.B. Hunter, 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. *American Phytopathological Society*. St. Paul. Minnesota. 218 pp.

Boerema, G. H., J. de Gruyter, M. E. Noordeloos, M. E. C. Hamers, 2004. *Phoma* Identification Manual: Differentiation of Specific and Infra-specific Taxa in Culture. *CABI Publishing*. Wallingford, UK.

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. *Commonwealth Mycological Institute*. Key, Surrey, England. 237 pp.

Britz, H., E. T. Steenkamp, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, W. F. O. Marasas, M. J. Wingfield. 2002. Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation. *Mycologia* 94: 722 – 730.

Brown, A. E., S. Sreenivasaprasad., L. Timmer, 1996. Molecular characterization of slow growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum. Phytopathology* 86: 523 - 527.

Burgess, T. I., P. A. Barber, S. Mohali, G. Pegg, W. de Beer, M. J. Wingfield. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98: 423 – 435.

Cantrell, S.A., D. J. Lodge, D. W. Minter, B. Ortiz Santana. 2006. Hongos de Puerto Rico. www.cybertruffle.org.uk/puerfung (versión 1.00, consultado 29-Junio-2010).

Cohen, G., C. Aguirre., F. V. Bladimir, 2001. Frutales Subtropicales Palta y Mango. Producción y Análisis del Mercado. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. 38 pp.

Colton, L., J.B. Clark. 2001. Comparison of DNA isolation methods and storage conditions for successful amplification of *Drosophila* genes using PCR. *Drosophilla Information Service* 84: 180-182.

Crous, P. W., B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Rheeder, W. F. O. Marasas, A. J. L. Phillips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber, J. Z. Groonewald. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Mycology* 55: 235–253

Denman, S., P. W. Crous, J. E. Taylor, J.C. Kang, I. Pascoe, M. J. Wingfield. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45: 129–140.

FAOSTAT. 2007. FAO Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. http://faostat.fao.org/. (consultado en 10-Julio-2010).

French, E. R., T. T. Herbert. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)*. San José, Costa Rica. 290 pp.

Gamliel-Atinsky, E., M. Maymon, S. Freeman, E. Palevsky, A. Sztejnberg, E. Belausov. 2009. Interaction of the mango bud mite, *Aceria mangiferae*, with *Fusarium mangiferae*, causal agent of mango malformation disease. *Acta Horticulturae (ISHS)* 820: 483 – 486.

Gupta, J. H. 1989. Perpetuation and epidemiology of powdery mildew of mango. *Acta Horticulturae (ISHS)* 231:528-533.

Hanlin, R. T. 1990. Illustrated Genera of Ascomycetes. Volume I. *APS Press*, St Paul. Minn. 263pp.

InfoStat (2008). InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, *Editorial Brujas*. Cordoba, Argentinas 314 pp.

Jedele, S, A. M. Hau, M. von Oppen, 2003. An Analysis of the World Market for Mangos and its Importance for Developing Countries. University of Hohenheim, Agricultural Marketing in the Tropics and Subtropics, Stuttgart, Germany.

Johnson, G.I., A. W. Cooke, A. J. Mead, I. A. Wells, 1991. Stem rot of mango in Australia: causes and control. *Acta Horticulturae* 291 (Abstract) 1p.

Johnson, G. I., A. Mead, A. Cooke, J. Dean. 1992. Mango stem end rot pathogens - Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals Apply Biology* 120: 225 - 234.

Konstantinova, P., Bonants, P. J.M., van Gent-Pelzar, M. P. E., van der Zouwen, P., R. van der Bulk. 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with botter and plating assays. *Mycological Research* 106: 23 - 33.

Kumar, J., U. S. Singh, S.P.S. Beniwal, 1993. Mango malformation: one hundred years of research. *Annual Review Phytopathology* 31: 217 - 232.

Kvas, M., E. T. Steenkamp, A. O. AlAdawi, M. I. Deadman, A. A. Aljahdawi, W. F. O. Marasas, B. D. Wingfield, R. C. Ploetz, M. J. Wingfield. 2008. *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation in the Sultanate of Oman. *European Journal Plant Pathology* 121: 195 - 199.

Leslie, J. F., B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. *Blackwell Publishing*, Oxford, UK. 388 pp.

Litz, R. E. 2009. The Mango. Botany, Production and Uses. Second Edition. *CABI.* Wallinford. 704 pp.

Lonsdale, J.H., J. M. Kotzé, 1993. Chemical control of mango blossom diseases and the effect on fruit set and yield. *Plant Disease* 77:558-562.

Marasas, W.F.O., R. C. Ploetz, M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, E. T. Steenkamp, 2006. Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. *Phytopathology* 96: 667 - 672.

Mills, P.R., S. Sreenivasaprasad, A. E. Brown, 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. FEMS *Microbiology Letters* 98: 137-144.

Morales-Rondón, V., M. Rodríguez-González. 2006. Hongos endofitos en plantaciones de mango 'Haden' de la planicie de Maracaibo, Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracaibo, Venezuela. *Revista Facultad de Agronomía (LUZ).* 23: 273-283.

Morton, J. F. 1987. Anacardiaceae. En: C. F. Dowling, Jr. (ed.). Fruits of Warm Climates. *Media Incorporated*. Greensboro, NC. pp. 221-248.

Nelson, S. C. 2008. Mango Powdery Mildew. Cooperative Extention Service. College of Tropical Agriculture and Humans Resources. University of Hawaii at Mañoa. Department of Plant and Environment Protection Sciences. 6pp.

Phillips, A.J.L., Alves, A., Correia, A., Luque, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97: 513-529.

Ploetz, R.C., 2003. Diseases of mango. En: Diseases of tropical fruit crops. *CABI Publishing,* Wallinford, UK. 327-363 p.

Ploetz, R.C., 2006. *Fusarium* - Induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96:648-652.

Ploetz R. C., G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrback, H. D. Ohr, 1994. Mango. En: Ploetz, R. C., R. E. Litz, eds. Compendium of Tropical Fruit Diseases. *APS Press,* Minnesota, pp.33-40.

Ploetz, R. C., D. Benscher, A. Vasquez, A. Colls, J. Nagel, B. Schaffer, 1996. A reexamination of mango decline in Florida. *Plant Disease* 80:664-668.

Prakash, O., 2003. Compendium of mango diseases and disorders. *Capital Publishing Company*, New Delhi. 84 pp.

Prusky, D., N. T. Keen. 1993. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Dise*ase 77: 2

Puerto Rico Department of Agriculture, 2008. Agricultural Annual Gross Income, revised data 2005-2006 and preliminary data 2006-2007. Commonwealth of Puerto Rico, San Juan, PR.

Ramos, L., J. S. P. Lara, R. T. Jr. MacMillan, K. R. Narayanan, 1991. Tip dieback of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Disease* 75:315-318.

Rivera, L., Y. Lugo, R. McGovern, T. Seijo, M. Davis, 2006. Occurrence and distribution of *Colletotrichum* spp. on mango (*Mangifera indica* L.) in Puerto Rico and Florida, USA. *Plant Pathology Journal* 5:191-198.

Schoeman, M.H. B. Q. Manicom, M. J. Wingfield, 1995. Epidemiology of powdery mildew on mango blossoms. *Plant Disease* 79:524-528.

Simmons, E. G., 2007. *Alternaria*. An identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Netherlands. 775 pp.

Slippers, B., P.W. Crous, S. Denman, T. A. Coutinho,B. D. Wingfield, M. J. Wingfield, 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96: 83 -101.

Slippers, B., G. I. Johnson, P. W. Crous, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, M. J. Wingfield, 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia* 97: 99-110.

Slippers B., M. J. Wingfield. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. The British Mycological Society. *Fungal Biology Review* 90-106 pp.

Toro, E. E. 1988. El cultivo de mangos en Puerto Rico. Servicio de Extensión Agrícola. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Colegio de Ciencias Agrícolas. 95pp.

Von Arx, J. A. 1974. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. *J. Cramer*. Vaduz, Liechtenstein.

White, T.J., T. Bruns., S. Lee., J. W. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: PCR Protocols: A guide to methods and applications. (eds. M.A. Innis, D.H. Gelgard, J.J. Snisky and T.J. White). *Academic Press*, N.Y. pp.315-322.

APENDICES

Análisis de la varianza

Cultivar	Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Haden	Severidad	64	0.41	0.35	136.34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	31529.53	6	5254.92	6.60	<0.0001
Etapa	31529.53	6	5254.92	6.60	<0.0001
Error	45413.83	57	796.73		
Total	76943.36	63			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=40.91318

Error: 796.7338 gl: 57

Etapa	Medias	n		
A	0.00	6	A	
B	0.00	7	A	
C	6.25	8	A	
D	7.50	10	A	
E	20.00	10	A	
F	22.92	12	A	
G	65.91	11		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cultivar	Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Irwin	Severidad	59	0.67	0.64	90.84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	43024.33	6	7170.72	17.90	<0.0001
Etapa	43024.33	6	7170.72	17.90	<0.0001
Error	20831.60	52	400.61		
Total	63855.93	58			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=30.22152

Error: 400.6076 gl: 52

Etapa	Medias	n		
B	0.00	8	A	
A	0.00	6	A	
C	3.13	8	A	
D	5.56	9	A	
F	22.50	10	A	
E	25.00	7	A	
G	75.00	11		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cultivar	Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Keitt	Severidad	59	0.54	0.48	118.25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20749.62	6	3458.27	10.06	<0.0001
Etapa	20749.62	6	3458.27	10.06	<0.0001
Error	17873.26	52	343.72		
Total	38622.88	58			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=27.95748

Error: 343.7166 gl: 52

Etapa	Medias	n		
B	0.00	8	A	
A	0.00	7	A	
C	0.00	7	A	
D	6.25	8	A	
E	11.11	9	A	
F	21.88	8	A	
G	50.00	12		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)

Cultivar	Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
Parvin	Severidad	54	0.54	0.48	156.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	19259.26	6	3209.88	9.05	<0.0001
Etapa	19259.26	6	3209.88	9.05	<0.0001
Error	16666.67	47	354.61		
Total	35925.93	53			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=29.79512

Error: 354.6099 gl: 47

Etapa	Medias	n		
D	0.00	8	A	
C	0.00	6	A	
A	0.00	6	A	
B	0.00	7	A	
E	5.56	9	A	
F	13.89	9	A	
G	52.78	9		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0.05)