

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y  
MOLECULAR DE HONGOS ASOCIADOS A FRUTALES EXÓTICOS  
TROPICALES, RAMBUTAN (*NEPHELIUM LAPPACEUM* L.) Y LONGÁN  
(*DIMOCARPUS LONGAN* L.) EN PUERTO RICO**

Por

Luz Miryam Serrato Díaz

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:

\_\_\_\_\_  
Lydia I. Rivera Vargas, Ph. D.  
Presidente, Comité Graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Consuelo Estévez, Ph. D.  
Miembro, Comité graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Ricardo Goenaga, Ph.D.  
Miembro, Comité graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Myrna Alameda, M.S.  
Miembro, Comité graduado

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Luis Rivera, Ph.D.  
Respresentante de Estudios Graduados

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Hipólito O'Farrill, Ph.D.  
Director de Departamento

\_\_\_\_\_  
Fecha

## RESUMEN

El rambután, *Nephelium lappaceum* L., y el longán, *Dimocarpus longan* L., son frutales exóticos tropicales que han ganado auge en el mercado internacional despertando interés en los agricultores de Puerto Rico. Sin embargo, es común encontrar en el campo lesiones en los diferentes órganos y enfermedades que ocurren durante el almacenaje de las frutas. El desconocimiento de los patógenos que afectan las frutas exóticas en Puerto Rico es un aspecto limitante en el manejo de los huertos y de las frutas en post-cosecha. Con el objetivo de identificar los hongos causales de enfermedades en frutas tropicales exóticas en campo y almacenaje, se colectaron diferentes órganos de árboles de rambután y longán en el período comprendido de agosto a septiembre del 2008 y abril a mayo del 2009. Las muestras se tomaron de árboles de la colección de USDA-ARS 'Tropical Agriculture Research Station' (TARS) en Mayagüez, Estaciones Experimentales Agrícolas de la Universidad de Puerto Rico, así como de fincas comerciales y privadas localizadas en el noroeste, oeste, centro y suroeste de la isla. El tejido vegetal fue desinfestado superficialmente y transferido a agar de papa y dextrosa acidulado APDA. Un total de 765 aislados de hongos fueron obtenidos del tejido vegetal sintomático y asintomático. El 75.16% de los aislados encontrados corresponden a rambután y el 24.83% a longán. El 80% de los aislados se caracterizaron morfológicamente y 20% fueron confirmados molecularmente mediante la amplificación de la región ITS del rDNA, obteniéndose 81 secuencias de hongos asociados a frutales exóticos tropicales. Se identificaron 27 géneros de hongos, de los cuales 17 pertenecen al Filum Ascomycota y 10 son hongos mitospóricos donde no se conoce su fase sexual. De los 27 géneros encontrados 9 géneros

fueron patogénicos al rambután y 5 al longán. *Botyosphaeria rhodina* fue el hongo más virulento, afectando ambos frutales causando lesiones en hojas, flores y frutos. *Albonectria rigidiuscula* y *Phoma* spp también fueron patógenos a los dos frutales exóticos tropicales presentando sintomatologías similares en inflorescencias, marchitez de la raquilla y momificación, respectivamente. *Lasmenia* sp., fue patogénico sólo a rambután afectando hojas, flores y frutos. *Calonectria pseudospathiphylli*, *Fusarium chlamydosporum*, *Glomerella cingulata*, *Leuconectria clusiae*, *Pestalotiopsis virgatula*, *Phomopsis longicolla* fueron patógenos de rambután causando necrosis de la fruta. *Fusarium culmorum* y *Pestalotiopsis clavispora*, fueron patógenos del longán afectando flores y frutos respectivamente. Las especies *Calonectria pseudospathiphylli*, *Leuconectria clusiae* y *Lasmenia* sp. son primeros reportes para Puerto Rico.

## ABSTRACT

Rambutan, *Nephelium lappaceum* L. and longan, *Dimocarpus longan* L., are exotic tropical fruits that have great importance in the international market, attracting great interest from farmers in Puerto Rico. However, it is common to find lesions in the different organs and diseases that occur during fruit storage. Ignorance of the pathogens that affect exotic fruits in Puerto Rico is a limiting aspect in the management of orchards and fruit post-harvest. To identify the causative agents of diseases in exotic tropical fruit in field and storage, different organs were collected from symptomatic and asymptomatic trees of rambutan and longan during the period from August to September 2008 and April to May 2009. Samples were taken from exotic fruit trees USDA-ARS 'Tropical Agriculture Research Station' (TARS) in Mayaguez, Agricultural Experiment Stations, University of Puerto Rico, commercial and private farms located at the northwest, west, central and southwest of the island. Plant tissue was superficially disinfected and transferred to potato dextrose agar acidified (APDA) to promote the development of fungi associated with injuries. A total of 765 fungal isolates were obtained from plant tissue examined. Seventy five percent of isolates were from Rambutan and 24.83% to longan. Eighty percent of the isolates were characterized morphologically and 20% of the isolates were characterized molecularly by amplification of the rDNA ITS region. Eighty one DNA sequences of fungi associated with exotic tropical fruit were obtained. Twenty seven genera of fungi, 17 Ascomycetes and 10 mitosporic fungi were identified. Of the 27 genera identified, 9 were pathogenic to rambutan and 5 to longan. *Botryosphaeria rhodina* was the most pathogenic fungus, affecting both exotic tropical fruits, causing

lesions on leaves, flowers and fruits. *Albonectria rigidiuscula* and *Phoma* spp. were also pathogenic to both exotic tropical fruit, with similar symptomatology in inflorescences, rachis wilt and mummification respectively. *Lasmenia* sp. was pathogenic to rambutan leaves, flowers and fruits. *Calonectria pseudospathiphylli*, *Fusarium chlamydosporum*, *Glomerella cingulata*, *Leuconectria clusiae*, *Pestalotiopsis virgatula*, *Phomopsis longicolla* were pathogens causing necrosis of rambutan's fruits. *Fusarium culmorum* and *Pestalotiopsis clavispora* were pathogens affecting longan, flowers and fruits, respectively. *Calonectria Pseudospathiphylli*, *Leuconectria clusiae* and *Lasmenia* sp. species are first reports for Puerto Rico.

## **DEDICATORIA**

*A la memoria de mi padre*

*Jorge Luis Serrato Zúñiga*

*y a mi madre*

*Luz Miryam Díaz de Serrato*

## AGRADECIMIENTOS

- Primero quiero agradecer a Dios, por todos los beneficios que me ha dado, por el privilegio de estar viva, por la salud y la fuerza para alcanzar los objetivos propuestos.
- A la señora Gladys Toro, por creer en mí y darme la oportunidad de superarme en mi vida.
- Agradezco a la Dra. Lydia I. Rivera Vargas, por brindarme su confianza, por su dedicación en mi aprendizaje para ayudarme a crecer profesionalmente.
- Al Dr. Ricardo Goenaga por su valiosa colaboración en este proyecto de investigación y por la dedicación a la revisión de este documento.
- A la Dra. Consuelo Estévez y la profesora Myrna Alameda por ser parte de mi comité graduado y por la dedicación a la revisión de este documento.
- Al MSc Angel Marrero y el Sr. Tomás Miranda de la Estación Agrícola Tropical (TARS) por su apoyo en la recolección del material vegetal en campo.
- A Elena Latoni, Ian Pagán y Diana Morales por su valiosa colaboración en este proyecto de investigación.
- A todos los integrantes del Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales, Programa de Protección de Cultivos.
- A los dueños de fincas privadas de rambután y longán en Puerto Rico.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE CUADROS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>8</b>
3.1 RAMBUTÁN ( <i>NEPHELIUM LAPPACEUM</i> L.).....	8
3.1.1 Origen .....	8
3.1.2 Clasificación taxonómica y morfología.....	8
3.1.3 Propagación.....	9
3.1.4 Cultivo.....	9
3.1.5 Variedades.....	10
3.2 LONGÁN ( <i>DIMOCARPUS LONGAN</i> L.) .....	10
3.2.1 Origen .....	10
3.2.2 Clasificación taxonómica y morfología.....	10
3.2.3 Propagación.....	11
3.2.4 Cultivo.....	12
3.2.5 Variedades.....	12
3.3 HONGOS ASOCIADOS A RAMBUTÁN Y LONGÁN (FRUTALES EXÓTICOS TROPICALES). 12	
3.3.1 Pudrición del pedúnculo .....	13
3.3.1.1 <i>Botryosphaeria</i> spp.....	13
3.3.1.1.1 Clasificación taxonómica.....	13
3.3.1.1.2 Características morfológicas.....	13
3.3.1.2 <i>Phomopsis</i> spp. ....	14
3.3.1.2.1 Clasificación taxonómica.....	14
3.3.1.2.2 Características morfológicas.....	15
3.3.2 Antracnosis .....	15
3.3.2.1 Clasificación taxonómica.....	16
3.3.2.2 Características morfológicas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum acutatum</i> .....	17
3.3.3 Pudrición de la fruta causada por <i>Gliocephalotrichum</i> .....	18
3.3.3.1 Clasificación taxonómica.....	18
3.3.3.2 Características morfológicas.....	19
3.3.4 Cancro del tallo .....	19
3.3.4.1 Clasificación taxonómica.....	20
3.3.4.2 Características morfológicas.....	20

3.3.5 Pudrición de la fruta por <i>Pestalotiopsis</i> .....	21
3.3.5.1 Clasificación taxonómica.....	21
3.3.5.2 Características morfológicas .....	21
3.3.6 Tizón por <i>Phytophthora</i> .....	22
3.3.6.1 Clasificación taxonómica.....	22
3.3.6.2 Características morfológicas .....	23
3.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	25
3.4.1 Espaciadores de Transcripción interna (ITS).....	26
3.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR POR SUS SIGLAS EN INGLÉS).....	29
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>31</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	31
4.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	31
4.3 AISLAMIENTO DE HONGOS ASOCIADOS A FRUTALES EXÓTICOS TROPICALES.....	33
4.4 CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE RAMBUTÁN Y LONGÁN.....	33
4.4.1 Características morfológicas .....	33
4.4.2 Caracterización molecular .....	35
4.4.2.1 Extracción y análisis de DNA.....	35
4.4.3 Pruebas de patogenicidad.....	39
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
5.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y AISLAMIENTO DE HONGOS ASOCIADOS A RAMBUTÁN Y LONGÁN. ....	48
5.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y PATOGENICA DE HONGOS ASOCIADOS A RAMBUTÁN ( <i>N. LAPPACEUM</i> ) Y LONGÁN ( <i>D. LONGAN</i> ) .....	54
5.2.1 Caracterización morfológica.....	54
5.2.1.1 <i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. ....	54
5.2.1.2 <i>Beltrania rhombica</i> (Penz.).....	54
5.2.1.3 <i>Botryosphaeria parva</i> (Pennycook & Samuels) .....	55
5.2.1.4 <i>Botryosphaeria rhodina</i> (Berk. & M.A. Curtis) .....	56
5.2.1.5 <i>Botryosphaeria ribis</i> (Grossenb. & Duggar) .....	57
5.2.1.6 <i>Calonectria pseudospathiphylli</i> J.C. Kang, Crous & C.L. Schoch.....	58
5.2.1.7 <i>Cladosporium</i> spp. (Fresenius) G.A. de Vries .....	58
5.2.1.8 <i>Cochliobolus lunatus</i> R.R. Nelson & F.A. Haasis .....	60
5.2.1.9 <i>Cochliobolus miyabeanus</i> (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur .....	61
5.2.1.10 <i>Dolabra nepheliae</i> C. Booth & W.P. Ting .....	61
5.2.1.11 <i>Eurotium</i> sp. Link .....	62
5.2.1.12 <i>Albonectria rigidiuscula</i> (Berk. & Broome) Rossman & Samuels.....	63
5.2.1.13 <i>Fusarium chlamydosporum</i> Wollenw. & Reinking .....	65
5.2.1.14 <i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Sm.) Sacc.....	65
5.2.1.15 <i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk .....	66
5.2.1.16 <i>Guignardia mangiferae</i> A.J. Roy.....	67
5.2.1.17 <i>Lasmenia</i> spp. Speg. ....	68
5.2.1.18 <i>Leptosphaerulina chartarum</i> Cec. Roux.....	68
5.2.1.19 <i>Leuconectria clusiae</i> Rossman, Samuels & Lowen.....	70
5.2.1.20 <i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome).....	71
5.2.1.21 <i>Pestalotiopsis</i> spp. Steyaert .....	71

5.2.1.22 <i>Phoma</i> spp. Sacc. ....	73
5.2.1.23 <i>Phomopsis</i> spp. Sacc. & Roum. ....	73
5.2.1.24 <i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not. ....	74
5.2.1.25 <i>Tetraploa aristata</i> Berk. & Broome. ....	75
5.2.1.26 <i>Trichoderma</i> spp. Pers. ....	76
5.2.1.27 <i>Tripospermum porosporiferum</i> Matsush. ....	76
5.2.1.28 <i>Tripospermum variabile</i> Matsush. ....	77
5.2.1.29 <i>Xylaria</i> spp. Hill ex Schrank. ....	78
5.2.1.30 Morfotipo 1 ....	78
5.2.2 Caracterización molecular ....	79
5.2.3 Caracterización patogénica ....	82
5.2.3.1 Pruebas de patogenicidad en rambután. ....	82
5.2.3.1.1 Hojas ....	82
5.2.3.1.2 Inflorescencias ....	86
5.2.3.1.3 Frutos ....	90
5.2.3.2 Pruebas en longán ....	105
5.2.3.2.1 Inflorescencias ....	105
5.2.3.2.2 Frutos ....	111
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>113</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>123</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>125</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>126</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ribosomas de los eucariotas (Tomado de Bridge <i>et al.</i> , 2000).....	26
<b>Figura 2.</b> Arreglo de los genes de los ribosomas en los eucariotas incluyendo las dos secuencias espaciadoras internas (ITS) (Tomado de Bridge <i>et al.</i> , 2000).....	27
<b>Figura 3.</b> Localización de los lugares de muestreo de material vegetal de frutales exóticos tropicales rambután y longán en Puerto Rico.....	32
<b>Figura 4.</b> Medida del porcentaje de severidad de la enfermedad en frutales exóticos tropicales. (A) Hojas, (B) Inflorescencias, (C) Fruto de longán y (D) Fruta de rambután.....	40
<b>Figura 5.</b> Distribución de géneros de hongos asociados a rambután y longán en Puerto Rico.....	48
<b>Figura 6.</b> Frecuencia de aislados de hongos encontrados en rambután y longán en diferentes localidades de Puerto Rico.....	52
<b>Figura 7.</b> <i>Alternaria alternata</i> (A) Cultivo puro en APDA y (B) Conidias en cadena.....	54
<b>Figura 8.</b> <i>Beltrania rhombica</i> (A) Cultivo puro en APDA, (B) Conidióforo y conidias y (C) Detalle de apéndice con división en la base (a) y banda transversal hialiana (b).....	55
<b>Figura 9.</b> <i>Botryosphaeria parva</i> (A) Cultivo puro en OA, (B y C) Conidias inmaduras de su anamorfo <i>Neofusicoccum parvum</i> .....	56
<b>Figura 10.</b> <i>Botryosphaeria rhodina</i> (A) Cultivo puro en OA, (B) Picnidio y conidias y (C) Conidia inmadura hialina (a) y madura pigmentada y con estraciones (b) en su estado anamorfo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	57
<b>Figura 11.</b> <i>Botryosphaeria ribis</i> (A) Cultivo puro en OA, (B y C) Conidias inmaduras hialinas de su anamorfo <i>Neofusicoccum ribis</i> .....	57
<b>Figura 12.</b> <i>Calonectria pseudospathiphylli</i> (A y B) Conidióforo y vesícula sobre hoja de clavel en CLA, (C) Conidióforo y conidias, (D) Estípite con vesícula terminal (flecha), (E) Conidias 1 septo (flecha), de su anamorfo <i>Cylindrocladium pseudospathiphylli</i> (F) Clamidosporas en cadena y (G) Cultivo puro en APDA.....	59

<b>Figura 13.</b> <i>Cladosporium</i> spp. (A) Cultivo puro en APDA, (B) Conidia limoniforme con cicatriz (Flecha) y (C) Conidias irregulares.....	60
<b>Figura 14.</b> <i>Cochliobolus lunatus</i> (A) Cultivo puro en APDA, (B) Conidióforo y conidias de su anamorfo <i>Curvularia lunata</i> .....	60
<b>Figura 15.</b> <i>Cochliobolus miyabeanus</i> (A) Cultivo puro en APDA y (B) Conidia de su anamorfo <i>Bipolaris oryzae</i> con vesículas globosas en el punto de germinación (flecha).....	61
<b>Figura 16.</b> <i>Dolabra nepheliae</i> (A) Sintomatología observada sobre corteza de rambután (B) Pseudotecio con ostiolo (flecha), (C) Ascas bitunicadas (flecha), (D) Ascosporas filiformes.....	62
<b>Figura 17.</b> <i>Eurotium</i> spp. (A) Cleistotecio (B) Ascas con ascosporas (C) Conidióforo de su anamorfo <i>Penicillium</i> spp.....	63
<b>Figura 18.</b> <i>Albonectria rigidiuscula</i> (A) Crecimiento inicial de cultivo puro en APDA (B) Crecimiento en cultivo puro a los 8 días en APDA, (C) Macroconidias de su anamorfo, <i>Fusarium decemcellulare</i> (D) Esporodoquio de su anamorfo sobre micelio en APDA, (E) Macroconidias y microconidias (flecha) de su anamorfo, (F) Peritecio y (G) Ascas con ascosporas (flecha).....	64
<b>Figura 19.</b> <i>Fusarium chlamydosporum</i> (A) Cultivo puro en APDA (B) Clamidosporas y (C) Microconidias.....	65
<b>Figura 20.</b> <i>Fusarium culmorum</i> (A) Cultivo puro en APDA (B) Macroconidias.	66
<b>Figura 21.</b> <i>Glomerella cingulata</i> (A) Cultivo puro en APDA (B) Peritecio con ascosporas (C) Setas y arcérvulos y (D) Conidias de su anamorfo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	67
<b>Figura 22.</b> <i>Guignardia mangiferae</i> (A) Cultivo puro en APDA (B) Conidias y (C) Detalle de la conidia de su anamorfo <i>Phyllosticta capitalensis</i> con apéndice (a) y envoltura mucoide (b).....	68
<b>Figura 23.</b> <i>Lasmenia</i> spp. (A) Cultivo puro del aislado 3II en APDA (B) Acérvulo observado con microscopía electrónica de rastreo (SEM), Detalle de conidias obclavadas en SEM (C) y microscopía de luz (D), (E) Conidias en (SEM) y (F) Conidias en microscopio de luz.....	69
<b>Figura 24.</b> <i>Leptosphaerulina chartarum</i> (A) Cultivo puro en APDA (B) Conidias de su estado anamorfo, <i>Pithomyces chartarum</i> .....	69

<b>Figura 25.</b> <i>Leuconectria clusiae</i> (A) Cultivo puro en APDA (B) Agregados bulbiliodes y (C) Conidióforo de su estado anamorfo <i>Gliocephalotrichum bulbilium</i> con estípites estériles (flecha).....	70
<b>Figura 26.</b> <i>Nigrospora oryzae</i> (A) Cultivo puro en APDA (B) Conidia.....	71
<b>Figura 27.</b> <i>Pestalotiopsis</i> spp. (A) Cultivo puro en APDA (B) Acérvulo, (C) Conidias con apéndices de <i>Pestalotiopsis clavispora</i> (flecha) y (D) Conidias con apéndices (flecha) de <i>Pestalotiopsis virgatula</i> .....	72
<b>Figura 28.</b> <i>Phoma</i> spp. (A) Cultivo puro en APDA (B) Picnidio obpiriforme con ostiolo (flecha) y (C) Conidias.....	73
<b>Figura 29.</b> <i>Phomopsis</i> spp. (A) Cultivo puro en APDA (B) Picnidio y (C) Conidias alfa (a) y beta (b).....	74
<b>Figura 30.</b> <i>Sordaria fimicola</i> (A) Cultivo puro en APDA, (B) Peritecio y ascas (C) Ascas unitunicadas con ascosporas y anillos apicales (flecha).....	75
<b>Figura 31.</b> Conidias de <i>Tetraploa aristata</i> (A y B).....	75
<b>Figura 32.</b> <i>Trichoderma</i> spp. (A) Cultivo puro en APDA y (B) Conidióforo y conidias (flecha).....	76
<b>Figura 33.</b> <i>Tripospermum porosporiferum</i> (A y B) Conidias, (C) Fumagina ocasionada por el hongo.....	77
<b>Figura 34.</b> <i>Tripospermum variabile</i> (A) Conidia y (B) Fumagina ocasionada por el hongo.....	77
<b>Figura 35.</b> <i>Xylaria</i> spp (A y B) Cultivo puro en APDA, (C y D) Estromas.....	78
<b>Figura 36.</b> Morfotipo 1 (A) Cultivo puro en APDA, (B) Picnidios con cirros (flecha) y (C) Conidias.....	79
<b>Figura 37.</b> Gel de electroforesis del producto de PCR de la región ITS del ADNr utilizando los primers ITS1/ ITS4 para <i>Botryosphaeria</i> spp. Primera fosa, marcador molecular de 1 kb; segunda fosa aislado 221.IV de <i>B. parva</i> ; tercera fosa aislado 71 de <i>B. rhodina</i> ; cuarta fosa aislado 231.I de <i>B. parva</i> ; cuarta fosa aislado 46.II de <i>B. rhodina</i> ; quinta fosa aislado 61.I de <i>B. rhodina</i> ; sexta fosa aislado 60.I de <i>B. rhodina</i> ; séptima fosa aislado 132.V de <i>B. parva</i> ; octava fosa aislado 251.I de <i>B. ribis</i> .....	80

<b>Figura 38.</b> Gel de electroforesis del producto de PCR utilizando los primers CgInt/ ITS4 específicos para <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	80
<b>Figura 39.</b> Gel de electroforesis del producto de PCR de los aislados 147.II y 220.II utilizando los primers CITRIC1/ITS4 y CAMEL2/ITS4. Primera fosa, marcador molecular de 1 kb; Segunda y tercera fosa, controles negativos con aislado 147.II de <i>C. gloeosporioides</i> ; cuarta y quinta fosa, aislado 220.II <i>G. mangiferae</i> con los primers CITRIC1/ ITS4 y quinta y sexta fosa, aislado 220.II con los primers CAMEL2 / ITS4.....	81
<b>Figura 40.</b> Promedio del porcentaje de severidad causada por <i>Botryosphaeria rhodina</i> (46.II) en tratamientos con y sin herida.....	82
<b>Figura 41.</b> Manchas necróticas con halo clorótico causadas por <i>Botryosphaeria rhodina</i> (46. II) sobre la hoja de rambután a los 8 días después de la inoculación. En el envés de la hoja se observan los picnidios del hongo.....	84
<b>Figura 42.</b> Promedio del porcentaje de severidad causada por los aislados de <i>Pestalotiopsis virgatula</i> .....	84
<b>Figura 43.</b> Manchas cloróticas con halo clorótico causadas por <i>Pestalotiopsis virgatula</i> (75.II) sobre la hoja de rambután tres DDI.....	85
<b>Figura 44.</b> Promedio del porcentaje de severidad causado por tres aislados de <i>Lasmenia</i> sp.....	85
<b>Figura 45.</b> Manchas necróticas con halo clorótico y centro blanco causadas por <i>Lasmenia</i> sp. (3.II) en hoja de rambután a los tres DDI. Reaislamiento de <i>Lasmenia</i> sp. en medio APDA.....	86
<b>Figura 46.</b> Necrosis y aborto floral observado en pruebas de patogenicidad con <i>Lasmenia</i> sp. (300.I) en inflorescencia de rambután. (A) Tratamientos con herida y (B) tratamientos sin herida.....	87
<b>Figura 47.</b> Necrosis, momificación de flores y quemazón de la raquilla causada por <i>Botryosphaeria rhodina</i> (289.V) en inflorescencia de rambután en tratamientos con herida a los 3,5 y 8 días después de la inoculación.....	88
<b>Figura 48.</b> Necrosis de las florecillas y marchitez de la raquilla causada por <i>Albonectria rigidiuscula</i> (48.IV) en inflorescencia de rambután (A) Tratamiento con herida y (B) Tratamiento sin herida.....	89
<b>Figura 49.</b> Pudrición blanda a lo largo de la raquilla, aborto y momificación floral causada por <i>Phoma</i> sp. (264.IV) en inflorescencias de rambután con herida a los 3,5 y 8 días después de inoculación.....	90

<b>Figura 50.</b> Promedio del porcentaje de severidad promedio para los aislados de <i>Botryosphaeria rhodina</i> .....	92
<b>Figura 51.</b> Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de <i>Botryosphaeria rhodina</i> en tratamientos con y sin herida.....	92
<b>Figura 52.</b> Necrosis de la fruta de rambután ocasionada por <i>Botryosphaeria rhodina</i> a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación. (A) Tratamientos con herida y (B) tratamientos sin herida.....	93
<b>Figura 53.</b> Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de <i>Calonectria pseudospathiphylli</i> .....	94
<b>Figura 54.</b> Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de <i>Calonectria pseudospathiphylli</i> en los tratamientos con y sin herida.....	95
<b>Figura 55.</b> Necrosis de fruta de rambután ocasionada por <i>Calonectria pseudospathiphylli</i> en tratamientos con y sin herida a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	96
<b>Figura 56.</b> Necrosis de fruta de rambután ocasionada por <i>Fusarium chlamydosporum</i> (218.II) en los tratamientos con herida a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	97
<b>Figura 57.</b> Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de <i>Glomerella cingulata</i> .....	97
<b>Figura 58.</b> Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de <i>Glomerella cingulata</i> en tratamientos con y sin herida.....	98
<b>Figura 59.</b> Pudrición de la fruta de rambután ocasionada por <i>Glomerella cingulata</i> a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	99
<b>Figura 60.</b> Colonización micelial de la fruta de rambután ocasionada por <i>Leuconectria clusiae</i> a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	99
<b>Figura 61.</b> Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de <i>Lasmenia</i> sp.....	100
<b>Figura 62.</b> Necrosis de la fruta de rambután ocasionada por <i>Lasmenia</i> sp. a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	101
<b>Figura 63.</b> Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de <i>Pestalotiopsis virgatula</i> en tratamientos con herida.....	102

<b>Figura 64.</b> Necrosis de fruta de rambután ocasionada por <i>Pestalotiopsis virgatula</i> a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación. (A) Tratamiento con herida y (B) tratamiento sin herida.....	103
<b>Figura 65.</b> Promedio del porcentaje de severidad de <i>Phomopsis longicolla</i> (175.III) en tratamientos con y sin herida.....	104
<b>Figura 66.</b> Necrosis de la fruta de rambután causada por <i>Phomopsis longicolla</i> a los 3, 5 y 8 días después de inoculación.....	105
<b>Figura 67.</b> Promedio del porcentaje de severidad de <i>Botryosphaeria rhodina</i> (81.I) en tratamientos con y sin herida.....	106
<b>Figura 68.</b> Muerte de florecillas y quemazón de la raquilla causada por <i>Botryosphaeria rhodina</i> (81.I) en inflorescencia de longán a los 5 y 8 días después de la inoculación. (A) Tratamientos sin herida y (B) tratamientos con herida.....	107
<b>Figura 69.</b> Marchitez de la raquilla y necrosis de las florecillas a los 8 días después de la inoculación causadas por (A) <i>Albonectria rigidiuscula</i> (229.II) y (B) <i>Fusarium culmorum</i> (245.VI).....	108
<b>Figura 70.</b> Promedio del porcentaje de severidad de <i>Pestalotiopsis clavispورا</i> (236.V) en tratamientos con y sin herida.....	108
<b>Figura 71.</b> Cancro, necrosis de florecillas, manchas necróticas y momificación de la raquilla causada por <i>Pestalotiopsis clavispورا</i> (236.V) a los 8 días después de la inoculación. (A) Tratamientos con heridas y (B) tratamientos sin herida.....	109
<b>Figura 72.</b> Cancro, momificación y necrosis de la raquilla causado por <i>Phoma</i> spp. (236.I) en inflorescencias de longán a los 5 y 8 días después de la inoculación. (A) Tratamientos con herida y (B) tratamientos sin herida.....	110
<b>Figura 73.</b> Pudrición interna del fruto de longán causada por <i>Botryosphaeria rhodina</i> (81.I) a los 3 y 5 días después de la inoculación en tratamientos con y sin herida.....	111
<b>Figura 74.</b> Pudrición interna del fruto de longán causado por <i>Pestalotiopsis clavispورا</i> (236.V) a los 3 y 5 días después de la inoculación en tratamientos con y sin herida. Se observa acérvulos sobre el tejido de la fruta.....	112

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Hongos asociados a rambután, lichi y longán a nivel mundial.....	3
<b>Cuadro 2.</b> Número de accesoión de las secuencias depositadas en el GenBank de los diferentes aislados de hongos encontrados en frutales exóticos tropicales en Puerto Rico.....	37
<b>Cuadro 3.</b> Géneros y aislados de hongos de diferentes órganos de rambután, <i>N. lappaceum</i> inoculados con disco de micelio (5 mm. de diámetro) y suspensión de esporas (conidias /ml) en tratamientos con y sin herida.....	42
<b>Cuadro 4.</b> Géneros y aislados de hongos de diferentes órganos de longán, <i>D. longan</i> inoculados con disco de micelio (5 mm. de diámetro) en tratamientos con y sin herida.....	45
<b>Cuadro 5.</b> Distribución de especies de hongos encontrados en rambután, <i>Nephelium lappaceum</i> y longán, <i>Dimocarpus longan</i> .....	50
<b>Cuadro 6.</b> Número de aislados y cantidad de géneros de hongos asociados a rambután y longán, encontrados en diferentes localidades de Puerto Rico.....	53
<b>Cuadro 7.</b> Severidad (%) de la enfermedad en hojas de rambután, <i>N. lappaceum</i> inoculadas con diferentes especies de hongos. Datos tomados a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	83
<b>Cuadro 8.</b> Severidad (%) de la enfermedad en inflorescencias de rambután ( <i>N. lappaceum</i> ), causadas por diferentes especies de hongos. Datos tomados a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	87
<b>Cuadro 9.</b> Severidad (%) de la enfermedad en frutas de rambután ( <i>N. lappaceum</i> ) causada por diferentes especies de hongos. Datos tomados a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	91
<b>Cuadro 10.</b> Severidad (%) de la enfermedad en inflorescencias de longan ( <i>D. longan</i> ) causada por diferentes especies de hongos. Datos tomados a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.....	106

## 1. JUSTIFICACIÓN

Las frutas tropicales y verduras, aportan a la economía mundial 1.4 billones de toneladas métricas (tm) distribuidos en 186 países, siendo el mayor productor la China con 506.634 tm, la India con 127.560 tm y por último Estados Unidos con 69.382 tm. Se estima que para el 2014 la producción mundial ascenderá a 82.1 millones de toneladas. De este total, el 78% corresponde a frutas como mango (*Mangifera indica* L.), piña (*Ananas comosus* L.), papaya (*Carica papaya* L.), aguacate (*Persea americana* L.) y el 22% restante a frutas secundarias como lichi (*Litchi chilensis* L.), longán (*Dimocarpus longan* L.), rambután (*Nephelium lappaceum* L.), guayaba (*Psidium guajava* L.) y granadilla (*Passiflora ligularis* L.) (FAO, 2004).

Se calcula que en el año 2004 se recogieron en el mundo 1.15 millones de toneladas de rambután, de los cuales los principales países productores fueron Tailandia (700,000 tm) en un área sembrada de 88.000 hectáreas, Indonesia (350,000 tm) en un área sembrada de 80,000 hectáreas y Malasia (70,000 tm) en un área sembrada de 20.000 hectáreas. Aunque China que no era considerado como un productor de rambután, en los últimos 10 años se ha convertido en un productor de importancia mundial y se estima que para el 2005 se sembraron 6,600 hectáreas de rambután (FAO, 2004). Las importaciones europeas de rambután para el 2004, oscilan entre 300 y 2,500 tm anuales, siendo los principales exportadores Tailandia, Indonesia y Malasia. Malasia es el principal exportador del mundo, seguido de Tailandia que supe mayormente el mercado Europeo y por último Indonesia que supe el mercado Holandés. Sin embargo, otros exportadores importantes en menor proporción son Australia, Puerto Rico y recientemente Colombia,

Honduras y Panamá (FAO, 2004). La producción de rambután para Estados Unidos se concentra en Hawaii y Puerto Rico. En Hawaii, el área sembrada es de 100 hectáreas con los rendimientos más altos del mundo y un aporte a la economía de 1.1 millones de dólares anuales. En Puerto Rico, se siembran 56 hectáreas de rambután mayormente el cultivar R167, con un aporte a la economía nacional de 0.23 millones de dólares (Crane *et al.*, 2005).

Otro frutal tropical exótico de importancia económica es el longán, siendo Tailandia el mayor productor y exportador de esta fruta. Para el 2007, Tailandia produjo cerca de 0.5 millones de toneladas con un aporte de 215 millones de dólares, presentándose una reducción del 30% en comparación al período de 2005 al 2007. Los principales destinos para el consumo de fruta fresca producidas en Tailandia para el año 2006 fueron China (43.94%), Indonesia (36.06%), Hong Kong (10.27%), Singapur (2.79%) y Filipinas (1.57%) (Evans y Nalampang, 2008). La producción de longán en los Estados Unidos es de 2.273 toneladas y se concentra en el sur de la Florida, Hawaii y California. En la Florida se sembraron 405 hectáreas de longán con un aporte anual de 19 millones de dólares, datos que corresponden a los cultivos de longán y lichi. En California se estima que se siembran 23 hectáreas de longán y lichi y en Hawaii se cultivan 36 hectáreas de longán aproximadamente (Evans y Nalampang, 2008). En Puerto Rico, su comercialización es limitada, sin embargo, la especie se introdujo en la isla hace más de 75 años. (Crane *et al.*, 2005; y Rivero y Brunner, 2007).

Por la gran aceptación de estos frutales exóticos en el mercado internacional y las divisas generadas a los países productores, se ha estimulado el interés de investigar su adaptabilidad y productividad en Puerto Rico como una fuente adicional de ingreso y aporte a la economía nacional. Es por esto, que para 1999 se establecieron siembras experimentales de longán, rambután, lichi y mangostán en la Estación Experimental Federal (USDA-TARS) en colaboración con la Estación Experimental Agrícola de Adjuntas e Isabela. Desde el 2003 existen siembras comerciales en los pueblos de Mayagüez, Cabo Rojo y Santa Isabel, Puerto Rico. Una de las limitantes en la producción de frutas exóticas tropicales son las plagas y enfermedades que deterioran su calidad. En la actualidad se han identificado 39 géneros y especies de hongos patógenos afectando el cultivo de frutas tropicales exóticas (Cuadro. 1) (Ploetz, 2003 y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2005).

**Cuadro 1.** Hongos asociados a rambután, lichi y longán a nivel mundial.

<b>Especie de hongos</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Distribución geográfica</b>
<i>Alternaria</i> spp	Enfermedad de post cosecha en fruta	Lichi	Tailandia, Florida
<i>Armillaria mellea</i>	Pudrición por <i>Armillaria</i>	Lichi	Sur África
<i>Armillaria sociales</i>	Pudrición por <i>Armillaria</i>	Lichi	Estados Unidos
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Pudrición del pedúnculo	Lichi, Rambután y longán	Tailandia y Estados Unidos
<i>Botryosphaeria</i> spp.	Pudrición del pedúnculo	Lichi, Rambután y longán	Tailandia y Estados Unidos
<i>Botrytis</i> spp.	Inflorescencia café	Rambután	Tailandia
<i>Cladosporium</i> spp.	Inflorescencia café	Rambután	Tailandia y Estados Unidos
<i>Cylindrocarpon tokinense</i>	Enfermedad de post cosecha en fruta	Lichi	Malasia
<i>Cylindrocladium</i> spp.	Muerte descendente	Lichi	Norte de Vietnam
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis en la hoja	Lichi, Rambután y longán	Tailandia, Estados Unidos, Australia
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Antracnosis	Lichi, Rambután y longán	Tailandia, Estados Unidos, Australia

**Cuadro 1.** Hongos asociados a rambután, lichi y longán a nivel mundial (Continuación).

<b>Especie de hongos</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Distribución geográfica</b>
<i>Diplodia</i> spp.	Muerte descendente	Lichi	Estados Unidos
<i>Erythricium salmonicolor</i>	Mal rosado	Rambután	Malasia
<i>Dolabra nepheliae</i>	Cancro del tallo	Rambutá y lichi	Malasia, Estados Unidos
<i>Fusarium decemcellulare</i>	Corteza corchosa	Lichi	Tailandia y Estados Unidos
<i>Geotrichum candidium</i>	Enfermedad de post cosecha en fruta	Lichi	Tailandia
<i>Geotrichum ludwigii</i>	Enfermedad de post cosecha en fruta	Lichi	Tailandia
<i>Gliocephalotrichum bulbilium</i>	Pudrición de la fruta por <i>Gliocephalotrichum</i>	Rambután	Tailandia Bangkok, Filipinas y Estados Unidos
<i>Gliocephalotrichum mycroclamidosporum</i>	Pudrición de la fruta por <i>Gliocephalotrichum</i>	Rambután	Tailandia, Bangkok, Filipinas y Estados Unidos
<i>Greeneria</i> spp.	Pudrición de la fruta por <i>Greeneria</i>	Rambután	Tailandia
<i>Meliola nephelii</i> var. <i>Singalensis</i>	Fumagina	Rambután	Tailandia y Estados Unidos
<i>Mycosphaerella</i> spp.	Enfermedad de post cosecha en fruta	Lichi	Tailandia
<i>Oidium nephelii</i> var. <i>Singalensis</i>	Añublo polvoriento	Rambután	Malasia
<i>Penicillium lilacinum</i>	Enfermedad de post cosecha en fruta	Lichi	Tailandia
<i>Peronophythora litchii</i>	Tizón del lichi	Lichi	China, Taiwan, Tailandia y Vietnam
<i>Pestalotiopsis mangiferae</i>	Tizón de la hoja y muerte descendente	Lichi	India
<i>Phoma epicoccina</i>	Enfermedad de post cosecha en fruta	Lichi	Tailandia
<i>Phomopsis</i> spp.	Tizón de la hoja	Lichi	Tailandia y Estados Unidos
<i>Phyllosticta</i> spp	Mancha de la hoja	Lichi	Tailandia y Estados Unidos
<i>Phytophthora botryosa</i>	Daño por <i>Phytophthora</i>	Rambután	Tailandia
<i>Phytophthora nicotianae</i>	Daño por <i>Phytophthora</i>	Rambután	Tailandia
<i>Phytophthora palmivora</i>	Daño por <i>Phytophthora</i>	Longán	Tailandia
<i>Pseudocercospora nephelii</i>	Enfermedad de plántulas	Rambután	Malasia
<i>Septobasidium bogoriense</i>	Tizón aterciopelado	Rambután	Tailandia

El diagnóstico fitopatológico es de vital importancia para evitar enfermedades en plantas y desarrollar e implementar estrategias específicas de control. La identificación de los hongos fitopatógenos está basada en su morfología (estructuras de reproducción como las conidias, color de las colonias, entre otras). Sin embargo, la estabilidad morfológica de muchos hongos se encuentra influenciada por condiciones ambientales, variabilidad genética y virulencia. Es por lo antes expuesto que la clasificación basada en la morfología, en ocasiones no es un criterio adecuado para diferenciar las especies, por lo que se debe complementar con identificación molecular que provee la base para discriminar entre un grupo complejo de especies (Atkins y Clark, 2004).

La molécula de ADN, es una tecnología que proporciona identidad genotípica a cada uno de los organismos, es la más utilizada puesto que las caracterizaciones morfológicas pueden variar por efectos del medio ambiente (Lewin, 2004). Técnicas como RAPDs (amplificación del ADN al azar), digestión del ADN con enzimas de restricción, y la amplificación de regiones no conservadas ya sean ribosomales (ITS - Secuencias Espaciadoras Internas) o intergénicas (IGS - Secuencias Espaciadoras Intergénicas), buscan explotar el polimorfismo existente entre las especies. Estas técnicas utilizan el ADN genómico del organismo para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) el gen o fragmento del ADN deseado. Aunque las regiones ITS del ADNr representan solo una parte del genoma permiten encontrar polimorfismos entre los géneros y son frecuentemente útiles a nivel de especies (White *et al.*, 1990, Hibbett, 1992, Atkins y Clark, 2004).

La presente investigación propone realizar la caracterización morfológica, patogénica y molecular de hongos aislados de los frutales exóticos tropicales rambután y longán en Puerto Rico. Se sentarán las bases para el diagnóstico de enfermedades en huertos de rambután y longán para un eficaz control de los patógenos presentados en condiciones de campo y post-cosecha.

## 2. OBJETIVOS

- Caracterizar morfológicamente hongos asociados a los frutales exóticos tropicales: longán y rambután en Puerto Rico.
- Realizar pruebas de patogenicidad con los hongos aislados de longán y rambután.
- Caracterizar molecularmente los hongos aislados en longán y rambután mediante el uso de región ITS del ADNr.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Rambután (*Nephelium lappaceum* L.)

##### 3.1.1 Origen

El nombre rambután proviene de la palabra “rambut” que significa pelo en idioma malayo. Es nativo de Malasia y su distribución se centra en el sur este de Asia. Fue introducido por primera vez a Malasia por comerciantes árabes entre Zanzíbar y Pemba y para 1912 fue llevado a Filipinas e Indonesia (Godoy-Torres y Reyes, 2007).

##### 3.1.2 Clasificación taxonómica y morfología

El rambután, *N. lappaceum* L., es miembro de la familia Sapindaceae. Es un árbol monoico o dioico que puede alcanzar 24.5 m de alto, sin embargo, en siembras comerciales no sobrepasa 13 m. Posee tronco erecto, con copa alta aunque los árboles que son injertados son ramificados y anchos. Las hojas son de color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés. Éstas son alternas, compuestas de 2 a 4 pares de folíolos, elípticos de 3.8 cm de ancho y 7.6 a 12.7 cm de largo. Las flores son pequeñas, sin pétalos, en panículas axiales perfectas machos o hembras y en árboles injertados las flores son hermafroditas. La fruta es una drupa ovoide a elipsoide de 5 a 7.6 cm de largo y 3.8 cm de ancho, es nutritiva y frágil y debe madurar en el árbol. La cáscara tiene diferentes colores que va desde roja, rosada, anaranjada y amarilla, posee protuberancias sobre la superficie de la fruta que parecen pelos, su pulpa es blanca, translúcida, aromática y dulce. La semilla es de la forma y tamaño de una almendra (Zee, 1993; Godoy-Torres y Reyes, 2007; Rivero y Brunner, 2007).

### **3.1.3 Propagación**

La manera más común de propagar el rambután es por injerto, utilizando técnicas como aproximación o el injerto de yema o escudete. Sin embargo, la propagación por semilla es factible. La germinación oscila entre 10 a 14 días después de sembrado, pero las semillas pierden viabilidad rápidamente si se dejan secar, aunque se pueden almacenar por un mes si se guardan en musgo o aserrín húmedo. Los árboles que provienen de semilla se utilizan como patrones para realizar injertos, puesto que los rambutanes provenientes de semilla se tardan más que los injertados en la producción de frutas. Además, la calidad y productividad son impredecibles y se pueden producir árboles machos (Rivero y Brunner, 2007).

### **3.1.4 Cultivo**

El rambután se adapta bien a las zonas tropicales húmedas con elevaciones de cero a 500 msnm. Crece en suelos fértiles, ácidos, profundos y bien drenados, con un alto contenido de materia orgánica. Responde a aplicaciones de abono completo cada 3 ó 4 meses durante los primeros cinco años después de la siembra del árbol, después del quinto año se realizan dos aplicaciones anuales (Rivero y Brunner, 2007).

Requiere de precipitación distribuida a través del año, no tolera temperaturas bajas, ya que por debajo de 5°C puede causar defoliación y muerte de los árboles. Se recomienda una distancia de siembra de 10 m entre árboles, si es menor la producción de la fruta disminuye cuando los árboles comienzan a tocarse pues la fruta se produce en los ápices de las ramas. Produce una fruta nutritiva y frágil que debe madurar en el árbol, la cual esta lista para la cosecha en un período de cuatro a siete semanas. La fruta madura es

fácilmente maltratada con una vida útil limitada (Anónimo, 2003; Godoy–Torres y Reyes, 2007; Rivero y Brunner, 2007).

### **3.1.5 Variedades**

Se conocen más de 212 variedades de rambután originarias de Malasia, Indonesia, Filipinas, Tailandia y Singapur. En Puerto Rico se siembran las siguientes variedades: R3, R134, R156, R162, R167, Binjai, Jitlee y Rongrien (Rivero y Brunner, 2007).

## **3.2 Longán (*Dimocarpus longan* L.)**

### **3.2.1 Origen**

El origen del longán (*D. longan* L.) se centra en el sur de China, suroeste de la India, Sri Lanka y la península de Indochina. Se encuentra ampliamente distribuido en el sureste asiático, sur de África y Estados Unidos. Fue introducido en 1903 a Estados Unidos y desde ese momento se siembra en Hawaii, California y el sur de la Florida, siendo este último la mayor concentración del área de producción en Estados Unidos. Fue solo hasta la década de los 90's que fueron establecidas la mayor parte de las áreas sembradas de longán al sur de la Florida (Crane *et al.*, 2004).

### **3.2.2 Clasificación taxonómica y morfología**

El longán, es un árbol de la familia Sapindaceae. Es simétrico con copa densa, corteza áspera en forma corchosa, de hojas perennes que conforman un follaje verde oscuro. Mide 15 m de alto, aunque dependiendo del clima y tipo de suelo puede superar los 30 m de altura. Las hojas son pinnadas, alternas, de color verde oscuro brillante en el haz y verde claro opaco en el envés, de 20 a 30 cm de largo, compuestas con 6 a 9 pares

de foliolos con márgenes onduladas y puntas agudas. Las flores son pequeñas blancuzcas con 5 a 6 sépalos y pétalos, se disponen en inflorescencias (panículas) terminales o axilares, erectas, ramificadas y poseen un pistilo bilobulado con 8 estambres. Las flores pueden ser estaminadas (machos), pistiladas (hembras) y hermafroditas en la misma panícula, la fruta es una drupa de forma ovalada o esférica y su diámetro varía de 2 a 3 cm, con cáscara áspera, de color castaño claro, con pulpa blanca translúcida que rodea a la semilla que es redondeada y de color castaño claro brillante (Crane *et al.*, 2004; Rivero y Brunner, 2007).

### **3.2.3 Propagación**

La propagación del longán puede realizarse por esquejes, acodo aéreo o injertos. Aunque puede propagarse por semilla éstas pierden viabilidad rápidamente. Las semillas deben sembrarse frescas y las variedades no replican las características en la progenie por lo que los frutos pueden ser de calidad inferior. Los árboles procedentes de semillas se utilizan principalmente como patrones para injertar debido a que tardan hasta siete años en producir fruta y su calidad y rendimiento son impredecibles. Cuando son utilizados los injertos, los más comunes son los laterales, aproximación y de púas. Los patrones se injertan cuando tienen el grosor de (1 cm). Aunque, la forma más común de propagar el longán es por acodo aéreo, las raíces por este método comienzan a formarse a las 10 a 12 semanas; sin embargo, árboles producidos por este método podrían ser más susceptibles a sufrir daños por vientos fuertes o huracanes (Anónimo, 2003; Crane *et al.*, 2004; Rivero y Brunner, 2007).

### **3.2.4 Cultivo**

El longán se adapta a climas subtropicales con veranos cálidos y húmedos e inviernos secos y frescos, puede cultivarse desde el nivel del mar hasta 500 metros sobre el nivel del mar (msnm). Produce frutos de manera regular en áreas con temperaturas bajas pero sin heladas (15°C) pues temperaturas inferiores de 5°C ocasionan daño severo y muerte de árboles jóvenes. Inviernos lluviosos y cálidos favorecen el crecimiento vegetativo, sin embargo, lluvias excesivas en el momento de la floración provoca la caída de flores, reduce la polinización y la formación de frutos. El buen drenaje es imprescindible, los árboles se pueden morir por exceso de humedad o por suelos inundados. En cuanto a la fertilidad de suelos, el longán no tolera alta salinidad en los suelos. Los síntomas de estrés por salinidad incluyen necrosis marginal y apical de las hojas, oscurecimiento y caída de hojas, muerte regresiva de tallos y árboles. Crecen bien en suelos profundos y fértiles, con pH entre 5.5 a 6. La producción del longán es errática, pues puede haber un año de buena producción seguido de dos años o más de poca o ninguna fructificación (Crane *et al.*, 2004; Rivero y Brunner, 2007).

### **3.2.5 Variedades**

En el sur este de Asia existen diversas variedades de longán. Las más conocidas en Puerto Rico, Florida y Hawaii son: Biew Kiew, Diamond River, Kohala y Sri Chompoo (Rivero y Brunner, 2007).

## **3.3 Hongos asociados a rambután y longán**

Se han reportado 24 especies de hongos asociados al rambután y 33 especies en longán distribuidos en el continente asiático y americano (Sangchote *et al.*, 1998; Ploetz,

2003 y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2005). A continuación se describen los hongos de mayor importancia económica en estos frutales.

### **3.3.1 Pudrición del pedúnculo**

La pudrición del pedúnculo de la fruta es una enfermedad que causa pérdidas post cosecha hasta un 30% en sapindaceas como lichi, rambután y longán (Zee, 1993; Ploetz, 2003 y 2007). La sintomatología de la enfermedad aparece en la corteza del pedúnculo como una decoloración café que rápidamente se extiende a toda la fruta. Los agentes causales reportados son *Botryodiplodia theobromae* (*Lasiodiplodia theobromae*), *Phomopsis* spp. y *Botryosphaeria* spp. Los procesos por el cual estos hongos infectan el lichi, rambután y longán no han sido establecidos, sin embargo, *B. theobromae* es un patógeno endófito que requiere de heridas para poder penetrar el tejido vegetal (Ploetz, 2003 y 2007).

#### **3.3.1.1 *Botryosphaeria* spp**

##### **3.3.1.1.1 Clasificación taxonómica**

*Botryosphaeria* es un organismo Eucariota, Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Dothideomycetes, Orden: Botryosphaeriales, Familia: Botryosphaeriaceae, Género: *Botryosphaeria* (Crous *et al.*, 2004)

##### **3.3.1.1.2 Características morfológicas**

Basado en la morfología de la conidia y análisis molecular que se discutirá más adelante, *Botryosphaeria* se divide en dos secciones: Brunnea e Hyala (Zhou y Stanosz, 2001). La sección Brunnea contiene a *B. rhodina* y anamorfos como *Diplodia*, *Lasiodiplodia* y *Sphaeropsis*. Inicialmente su anamorfo fue descrito por primera vez por

Saccardo en 1894 como *Botryodiplodia* y en 1892 Pat reportó la especie *Botryodiplodia theobromae*. Para 1909 el género y especie cambian a *Lasiodiplodia theobromae* (Griff & Maubl) y finalmente en 1923 se denomina *Diplodia theobromae*. La especie produce un picnidio de 2 a 4 mm de diámetro, con células conidiógenas de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de largo por 3  $\mu\text{m}$  de ancho. La conidia tiene un tamaño de 20 a 30  $\mu\text{m}$  de largo y 10 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho. Se producen conidias hialinas, aseptadas, granulares de forma ovoide a elipsoide con pared delgada en su estado inmaduro, a medida que alcanzan su madurez se tornan café oscuras, bicelulares con numerosas estriaciones longitudinales. El micelio es de color gris a negro con consistencia suave en agar de papa y dextrosa (PDA) o agar de avena (OA) (Sutton, 1980; Holliday, 1980; Denman *et al.*, 2000; Zhou y Stanosz, 2001).

La sección *Hyala* incluye a *B. dothidea* con anamorfos que producen conidias hialinas menores a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, con el tiempo pueden tornarse café claro, picnidios diferenciados y micelio gris de consistencia suave en PDA. Los pseudotecios son globosos a piriformes de 120 a 210  $\mu\text{m}$ , inmersos en la epidermis del tejido vegetal. Las ascas son bitunicadas con ascosporas hialinas unicelulares, fusiformes con tamaños de 16 a 25  $\mu\text{m}$  de largo y 4.5 a 9.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Zhou y Stanosz, 2001).

### **3.3.1.2 *Phomopsis* spp.**

#### **3.3.1.2.1 Clasificación taxonómica**

*Phomopsis* es un organismo Eucariota, Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Sordariomycetes, Orden: Diaporthales, Familia: Valsaceae, Género: *Phomopsis* (Crous *et al.*, 2004).

### **3.3.1.2.2 Características morfológicas**

*Phomopsis* fué descrito por primera vez por Saccardo y Sidow en 1905, presenta micelio inmerso, ramificado, septado, hialino a café claro. Picnidio inmerso de color café oscuro, globoso que puede ser aplanado, uni o multi locular, con paredes delgadas. Puede tener un ostiolo o varios, circular a menudo papilado con conidióforos ramificados y septados desde la base o por encima de la base. Los conidióforos son multiseptados, filiformes, hialinos ocasionalmente cortos con uno a dos septos. Posee células conidiógenas enteroblásticas, hialinas, cilíndricas, las cuales presenta dos tipos de conidias la  $\alpha$ -conidia que es hialina, fusiforme, erecta y aseptada, la  $\beta$ -conidia hialina, filiforme (en forma de hoz), erecta y aseptada (Sutton, 1980).

### **3.3.2 Antracnosis**

La antracnosis es una de las principales enfermedades en longán, rambután y lichi en pre y post cosecha. Es causada por diferentes especies del género de *Colletotrichum* spp. y se ha observado el desarrollo de esta enfermedad en hojas, flores y frutos en regiones con altas precipitaciones (Ploetz, 2003).

La antracnosis desarrollada en frutos inmaduros de lichi puede causar aborto, sin embargo, esta enfermedad comúnmente afecta los frutos de lichi y rambután en post cosecha o cuando se encuentran sobre maduros en el campo. Su sintomatología aparece como lesiones circulares de color negro a café oscuro en la cáscara de las frutas. En casos severos de la enfermedad, las manchas coalescen extendiéndose por toda la fruta oscureciéndola completamente. En infecciones tempranas, el inóculo se mantiene en las hojas y las condiciones de humedad favorecen el desarrollo y diseminación del patógeno. En frutas en almacenamiento se observa micelio de color blanco con masas de conidas de

color salmón sobre la superficie de las lesiones (Ploetz, 2003; Wharton y Diéguez, 2004; Rivero y Brunner, 2007).

Los pasos iniciales para la penetración y la infección de las especies de *Colletotrichum* spp. son similares, en general, la conidia se adhiere a la superficie del hospedero mediante la formación del apresorio, penetrando la cutícula del hospedero y así colonizando los tejidos. Se describen dos tipos de interacciones entre *Colletotrichum* spp. y sus hospederos: una fase intercelular hemibiotrófica y una intracelular necrotrófica (Prusky *et al.*, 2000; Timmer *et al.*, 2005; Diéguez *et al.*, 2005).

En la penetración intracelular hemibiotrófica se establece una infección inicial que conlleva a la formación de una hifa primaria intracelular. Ésta se convierte en una fase necrotrófica con la producción de hifas angostas secundarias que se ramifican tanto intercelular como intracelularmente a través del hospedero. Eventualmente ocurre la muerte de las células vegetales debido a la producción de enzimas proteolíticas: quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanos. La penetración necrotrófica intracelular se lleva a cabo una vez es penetrada la cutícula, desarrollándose el hongo entre la pared periclinal y anticlinal de las células epidermales, extendiéndose inter e intracelularmente por el tejido vegetal degradando la pared celular de su hospedero (Prusky *et al.*, 2000; Timmer *et al.*, 2005; Diéguez *et al.*, 2005).

### **3.3.2.1 Clasificación taxonómica**

*Colletotrichum* es un organismo Eucariota, Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Sordaryomycetes, Orden: Phyllachorales, Familia: Phyllachoracea, Subfamilia: Phyllachoraceae mitosporicos, Género: *Glomerella* (anamorfo: *Colletotrichum*) (Crous *et al.*, 2004).

### 3.3.2.2 Características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. & Sacc.) fue descrito en el año 1884 y es una especie de amplia distribución en todo el mundo especialmente en zonas tropicales y subtropicales. Von Arx (1957) citó más de 600 sinónimos lo cual indica la gran diversidad del género. Aunque algunas de estas especies han cambiado el nombre genérico, la gran mayoría se han incluido dentro del grupo de *C. gloeosporioides*. Por su parte, no todas las especies del género *Gloeosporium* se han incluido en *Colletotrichum*, ya que se han reclasificado como *Marssonina*, *Cryptosporioides*, *Piggotia*, entre otros (Sutton, 1992).

La conidia de *C. gloeosporioides* es oblonga con terminales agudos, mientras que para *C. acutatum* son elípticas y fusiformes. La presencia de su teleomorfo *Glomerella cingulata* para *C. gloeosporioides* y *Glomerella acutata* para *C. acutatum* es de gran ayuda para la clasificación de estas especies. Sin embargo, este criterio de clasificación anteriormente mencionado no es el adecuado para la clasificación de las especies de *Colletotrichum*, puesto que condiciones ambientales influyen la estabilidad morfológica de las conidias. De manera general, la forma de las colonias y el color pueden variar de una especie a otra. *C. acutatum* muestra una pigmentación que va de rojo a salmón en el reverso del cultivo, mientras que la coloración de *C. gloeosporioides* varía de blanco a gris oscuro. Se ha reportado que aislados de *C. acutatum* se desarrollan a una tasa de crecimiento lento con respecto a los aislados de *C. gloeosporioides* (Dyko y Mordeu, 1979; Bailey y Jeger, 1992; Freeman *et al.*, 2000).

### **3.3.3 Pudrición de la fruta causada por *Gliocephalotrichum***

La pudrición de la fruta causada por *Gliocephalotrichum* es una enfermedad importante post cosecha en rambután, alcanzando pérdidas del 10% en frutos almacenados. La enfermedad ha sido reportada en Sri Lanka, Filipinas, Malasia y Hawaii sobre frutos. Las especies comúnmente encontradas han sido *Gliocephalotrichum bulbilium*, *G. simplex*, *G. ohiense*, *G. longibrachim*, *G. cylindrosporum* y *G. mirochlamydosporum* (Wiley y Simmons, 1971; Huang y Schmitt, 1973; Sivakumar *et al.*, 1997; Nishijima *et al.*, 2001; Ploetz, 2003).

Los síntomas se desarrollan después de la cosecha, el hongo se presenta de forma latente en campo. Inicialmente aparece como una lesión húmeda de color café claro sobre la corteza y la pulpa de la fruta la cual se alarga, oscurece y progresa ennegreciendo y secando el pericarpio que termina por partirse y exponer el arilo. Bajo condiciones de alta humedad el hongo cubre severamente los frutos con un micelio de color amarillo. En ciertos cultivares de rambután se presenta una momificación de frutos inmaduros que es producto del desarrollo de la enfermedad. (Nishijima *et al.*, 2001; Ploetz, 2003). Las aplicaciones de fungicidas (i.a. carbendazim) antes y después de la cosecha han sido efectivos para el control de la enfermedad al igual que almacenaje de las frutas a bajas temperaturas (13 °C) (Farungsang *et al.*, 1992).

#### **3.3.3.1 Clasificación taxonómica**

*Gliocephalotrichum* es un organismo Eucariota, Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Sordaryomycetes, Orden: Hypocreales, Familia: Nectriaceae, Subfamilia: Nectriaceae mitospóricos, Género: *Gliocephalotrichum* (Crous *et al.*, 2004).

### 3.3.3.2 Características morfológicas

*Gliocephalotrichum* fue descrito por primera vez en 1962 con una sola especie, *G. bulbilium*, (Ellis y Hesseltine, 1962). En 1993 Rossman *et al.*, demostraron una conexión entre su fase sexual y el teleomorfo *Leuconectria clusiae*. El género se caracteriza por la presencia de extensiones de setas estériles, posee desde un verticilio no ramificado hasta pluri-verticilado, con fiálidas simples, pequeñas, hialinas, fialoconidias aseptadas que puede acumularse en masas mucilaginosas (Decock *et al.*, 2006).

Se han descrito seis especies del género: *G. cylindrosporum*, *G. microchlamydosporum*, *G. simplex* (Wiley y Simmons, 1971), *G. ohiense* (Huang y Schmit, 1973) y *G. bacillisporum* y *G. longibrachium* (Decock *et al.*, 2006).

El género se encuentra dividido en dos grupos según las características morfológicas, las cuales se distinguen por la localización de las setas estériles con respecto al penicilio. Si se encuentran próximos al penicilio puede tratarse de las especies *G. bulbilium*, *G. microchlamydosporum*, *G. longibrachium*, *G. bacillisporum* y *G. ohiense*, si se encuentran debajo del penicilio puede tratarse de las especies *G. cylindrosporum* y *G. simplex* (Wiley y Simmons, 1971; Decock *et al.*, 2006).

### 3.3.4 Corteza corchosa

El agente causal del cancro del tallo es *Dolabra nepheliae*. Éste afecta los árboles de la familia de las sapindaceas como rambután, litchi y pulasan (*N. mutabile* L.). Ha sido identificado en el sur este asiático, Honduras, Hawai y Puerto Rico (Booth y Ting, 1964; Zalasky *et al.*, 1971; Rivera, com. pers. 2007; Rossman *et al.*, 2007).

Los primeros síntomas aparecen en el envés de las hojas y se observan ampollas y tumores a lo largo de las venas o una ligera hinchazón del nervio medio y el peciolo

que terminan por necrosarse. La enfermedad también produce canchales extensivos con formación de numerosos ascostromas, principalmente en troncos y ramas laterales. Se observa hinchazón de color marrón a negro sobre la corteza del árbol que rápidamente se torna necrótica y se rompe horizontal y verticalmente. Las lesiones contienen fisuras profundas, oscuras, con escamas y tejidos suberificados de 2 a 3 mm de diámetro que se expanden y se fusionan con pústulas adyacentes hasta formar lesiones extensas que pueden rodear el tallo o las ramas. La infección del tallo puede ocurrir a través del sistema vascular desde los peciolos o directamente desde la epidermis. Es posible, que heridas causadas por insectos que anidan en las hojas y en las ramas, tales como áfidos y hormigas (*Oecophylla smaragdina* Fab.), predispongan la infección del hospedero (Booth y Ting, 1964; Zalasky *et al.*, 1971).

#### **3.3.4.1 Clasificación taxonómica**

*Dolabra nepheliae* es un organismo eucariota perteneciente al Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Dothidiomycetes, Orden: Dothidiales, Género: *Dolabra* (Crous *et al.*, 2004).

#### **3.3.4.2 Características morfológicas**

*Dolabra nepheliae*, fue descrito por primera vez por Booth y Ting en 1964 en Malasia. Produce ascostromas piriformes de 400 a 600  $\mu\text{m}$  de largo por 250 a 300  $\mu\text{m}$  de ancho. El micelio es de color gris a blanco verdoso, forma un lóculo en la parte superior de la matriz con una región basal estrecha, tiene pared delgada y células pseudoparenquimatosas con depósitos de taninos. Posee pseudoparáfises clavados de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las ascas son bitunicadas de 115 a 160  $\mu\text{m}$  de largo por 10 a 14  $\mu\text{m}$  de

ancho y contiene 8 ascosporas orientadas paralelamente, hialinas, de 3 a 5 septos, con una longitud de 85 a 113  $\mu\text{m}$  de largo por 3 a 4  $\mu\text{m}$  de ancho. El ostiolo es de forma cilíndrica y no es formado hasta que las ascosporas están maduras. Se asocia genéticamente el ascocarpo de *D. nepheliae* con el picnidio de *Rhabdospora nepheliae* producido en PDA y OA en colecciones de rambután y pulasán (Zalasky *et al.*, 1971).

### **3.3.5 Pudrición de la fruta por *Pestalotiopsis***

La pudrición de la fruta causada por *Pestalotiopsis virgatula*, es uno de los principales enfermedades de rambután en Malasia, Australia, Tailandia y Hawaii. Aparece principalmente en frutas maduras e inmaduras de rambután como manchas de color café oscuro a negro en la base de los pelos que termina por necrosar todo el fruto. Las condiciones de humedad alta favorecen el desarrollo del micelio sobre la superficie de las lesiones y se recomienda el almacenamiento de las frutas a 10°C para evitar la enfermedad (Sangchote *et al.*, 1998; Ploetz, 2003; Keith, 2008).

#### **3.3.5.1 Clasificación taxonómica**

*Pestalotiopsis* es un organismo Eucariota, Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Sordaryomycetes, Orden: Xylariales, Familia: Amphisphaeriaceae, Género: *Pestalotiopsis* (Crous *et al.*, 2004).

#### **3.3.5.2 Características morfológicas**

*Pestalotiopsis* fué descrito por primera vez por Steyaert en 1949. Presenta micelio inmerso, ramificado y septados, puede ser hialino a café pálido, con conidiomata acervular epidérmica o subepidérmica (Sutton, 1980). Presenta conidióforos hialinos, septados en la base y en la parte superior, cilíndricos con células parenquimatosas en la

parte superior. Las conidias son fusiformes, rectas o ligeramente curvas, con cuatro septos: una célula basal hialina, truncada o con apéndice ramificado, una célula apical hialina con dos o más apéndices simples o ramificados y dos células medianas de color marrón, de paredes gruesas y lisas (Guba, 1961; Crous *et al.*, 2004).

### **3.3.6 Tizón por *Phytophthora***

*Phytophthora* spp. es uno de los principales problemas en longán, aunque también afecta al rambután en menor proporción. Se presenta principalmente en temporadas frías y lluviosas. La sintomatología en longán, va desde tizones foliares y florales, aborto floral, caída prematura de frutos, necrosis de brotes jóvenes y pudrición de los frutos. En temporadas de alta precipitación, los frutos se agrietan y en las lesiones pueden observarse los esporangios y esporangióforos del patógeno (Ploetz, 2003).

En el rambután se desarrollan manchas de color negro sobre la corteza de la fruta que afectan el arilo produciendo mal olor. Los frutos pequeños son más susceptibles a la enfermedad ocasionando marchitez y caída. Se han reportado algunas especies de *Phytophthora*: *Phytophthora palmivora* para longán, *P. nicotianae* y *P. botryosa* para el rambután. En los dos hospederos el desarrollo de la enfermedad es favorecida por condiciones de humedad, pues el agua favorece la producción de los esporangios y la liberación y movimiento de las zoosporas (Ploetz, 2003).

#### **3.3.6.1 Clasificación taxonómica**

*Phytophthora* pertenece al Reino: Chromista, Phylum: Oomycota, Clase: Oomycetes, Orden: Peronosporales, Familia: Pythiaceae (Crous *et al.*, 2004).

### 3.3.6.2 Características morfológicas

*Phytophthora* spp. posee hifas vegetativas, diploides, cenocíticas, con paredes celulares compuestas de celulosa y quitina. Produce una gran variedad de propágulos incluyendo clamidosporas, oosporas, esporangios y zoosporas (Ploetz, 2003).

Las oosporas son esporas sexuales que se forman de la fusión del anteridio con el oogonio. Las diferentes especies se pueden clasificar según la posición del anteridio con respecto al oogonio, el área que ocupa la oospora con respecto al oogonio (plerótico o aplerótico) y las papilas de los esporangios. Algunas especies producen clamidosporas que son estructuras de supervivencia capaces de permanecer latentes en el suelo o en los tejidos de las plantas hasta encontrar condiciones favorables para su germinación (Donald y Ribeiro, 1996).

Las zoosporas son esporas asexuales producidas por los esporangios, los cuales poseen flagelos en la parte posterior y anterior que le permite nadar a través de los poros del suelo. Las condiciones de humedad en el suelo facilitan su movilidad y es por esto que los casos más severos de la enfermedad se presentan en suelos inundados o con un drenaje pobre. Las zoosporas son atraídas hacia la superficie radicular por quimiotaxis y electrotaxis, una vez las zoosporas llegan a la rizosfera se enquistan y comienzan a infectar el hospedero (Morris y Gow, 1993; Van West *et al.*, 2002; Ploetz, 2003).

En la familia de las sapindáceas, se han reportado las especies: *P. palmivora*, *P. botryosa* y *P. nicotianae*. *Phytophthora palmivora* fue descrita por primera vez por Butler en 1910. Las dimensiones de los esporangios, clamidosporas, órganos sexuales, y el crecimiento de los aislados dependen del hospedero. Los esporangios son papilados con formas variables, ovoides, esféricos o elipsoides, con un tamaño de 35 a 60  $\mu\text{m}$  en

longitud y pedicelo corto menor a 5  $\mu\text{m}$  de largo. Cada esporangio descarga de 10 a 40 zoosporas cuando son incubados en agua. Las clamidosporas son terminales intercaladas con un diámetro promedio de 33  $\mu\text{m}$ .

*Phytophthora palmivora* es heterotálica, forma oosporas ligeramente apeleróticas por los cruces de cepas A1 y A2. El oogonio y la oospora son esféricos, con un diámetro de 17 a 29  $\mu\text{m}$ . El anteridio es anfígeno, con un diámetro de 12 a 16  $\mu\text{m}$ . El mínimo de temperatura de crecimiento para esta especie es de 11°C, con una temperatura óptima de 27.5 a 30°C y un máximo de 35 °C (Donald y Ribeiro, 1996; Ploetz, 2003; Gallegly y Hong, 2008).

*Phytophthora botryosa* fué descrita por primera vez por Chee en 1969, aislado a partir del árbol de caucho *Hevea brasiliensis* en Malasia y Tailandia. Es heterotálica, las oosporas son producidas cuando las cepas A1 de *P. meadii* y A2 *P. botryosa* son pareadas. Posee anteridio anfígeno, circular de 13.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. El oogonio es esférico de 25 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y contiene oosporas pleróticas de 24  $\mu\text{m}$  en diámetro. Los esporangios son de color amarillento, se producen en grupos (alrededor de 90 esporangios por cada grupo), papilados, de forma oval a veces ovoides, con un tamaño de 30  $\mu\text{m}$  de largo por 16  $\mu\text{m}$  de ancho, tiene pedicelos medianos de 8  $\mu\text{m}$  de longitud y son producidos sobre esporangióforos ramificados. Las clamidosporas raramente formadas, tienen un rango de 14 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y en promedio 18.7  $\mu\text{m}$  de longitud. La temperatura mínima del crecimiento es de 9°C, con una temperatura óptima de 26°C y una temperatura máxima de 32°C (Donald y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008).

*Phytophthora nicotianae* fué descrita por primera vez por Breda de Haan en 1896. Para el año 1913 Dastur la denominó *P. parasitica*. Sin embargo, por sus patrones

polimórficos mediante análisis de rDNA de las regiones ITS confirman que son la misma especie, utilizándose solamente *P. nicotianae* var. *parasitica* (Gallegly y Hong, 2008). *Phytophthora nicotianae* es heterotálica, produce abundantes cuerpos sexuales en agar de habas (LBA) cuando las cepas A1 y A2 son pareadas. Las oosporas apleróticas tienen 20 µm de diámetro. Los anteridios son anfígenos de forma ovalada o esférica con un diámetro de 13 µm, el oogonio es suave y esférico. Los esporangios poseen una papila prominente con pedicelos cortos, de forma variada pueden ser elipsoides, ovoides o esféricos, son producidos por separado o a lo largo de los tallos, miden 45 µm de largo por 37 µm de ancho. Producen abundantes clamidosporas, pueden ser terminales o intercaladas con un tamaño promedio de 30 µm. El mínimo de la temperatura para el crecimiento varía de 5 a 7°C con una temperatura óptima de 27 a 32 °C y una temperatura máxima de 35°C (Ploetz, 2003; Donald y Ribeiro, 1996; Gallegly y Hong, 2008).

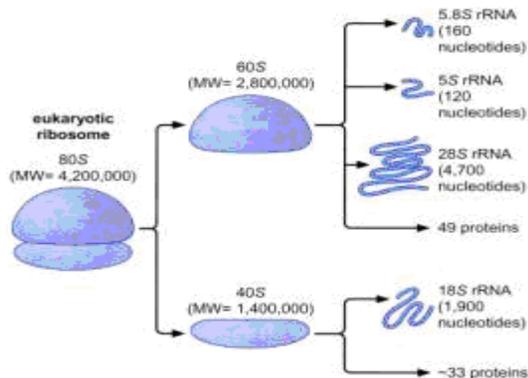
### **3.4 Caracterización molecular**

Los criterios de clasificación basados en la utilización de métodos tradicionales como los son el tamaño de la conidia, producción de estructuras de reproducción (picnidios, acérvulos, ascostromas, etc.), color de la colonia, morfología de la colonia, compatibilidad vegetativa, crecimiento, entre otros, han sido de gran ayuda en la identificación de las especies de microorganismos fitopatógenos. Sin embargo, estos criterios de clasificación suelen no ser suficientes para tomar medidas de acción contra una enfermedad, debido a los cambios en los patrones morfológicos del patógeno por variación en las condiciones ambientales que resultan en una confusión en la clasificación taxonómica de las especies (Prusky *et al.*, 2000).

El uso de técnicas moleculares ha sido utilizado para la discriminación entre las especies y genotipos de hongos. Dichos estudios se han concentrado principalmente en el uso del ADN ribosomal (ADNr), ADN mitocondrial (ADNm), gen de  $\beta$  tubulina, cebadores o “primers” específicos como por ejemplo *CgInt* y *CaInt2* para la caracterización de especies de *Colletotrichum* y los primers CAMEL2 y CITRIC1 para la identificación de las especies de *Guignardia* (White *et al.*, 1990; Glass y Donaldson, 1995; Brown *et al.*, 1996; Prusky *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2006).

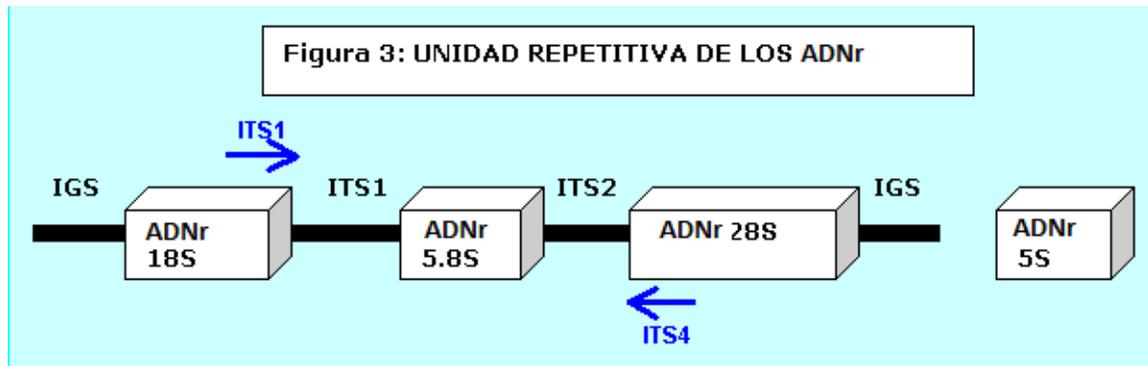
### 3.4.1 Espaciadores de Transcripción interna (ITS)

Las células eucariotas tienen ribosomas de 80S con una subunidad de 40S y otra de 60S. La subunidad de 40S está formada por 33 proteínas y un ARN ribosómico de 18S (18S ARNr). La subunidad de 60S consiste de 49 proteínas y 3 tipos de moléculas de rRNA: 5S, 5.8S y 28S (5S ARNr, 5.8S ARNr y 28S ARNr) (Fig. 1).



**Figura 1.** Ribosomas de los eucariotas (Tomado de Bridge *et al.*, 2000).

En la mayoría de los organismos eucariotas la secuencia de ADN donde se ubican los genes que codifican para los ARNr, es conocida como ADNr. En hongos (filamentosos y levaduras), el ADNr (ADN que codifica al ARNr) está organizado como una unidad que se repite una detrás de la otra. Cada unidad incluye tres genes de ARNr: el gen que codifica para el 18S ARNr, el gen para 5.8S ARNr y el gen para 28S ARNr. Además, en cada unidad, los genes están separados por dos secuencias espaciadoras internas que se denominan **ITS1 e ITS2** (Fig. 2). Cada unidad de ADNr se encuentra separada por un espaciador intergénico, IGS (Inter Genic Spacer). Cuando se transcribe el ADNr que codifica para los genes para cada uno de los ARNr que forman los ribosomas eucariontes, las regiones espaciadoras, no codificantes, quedan representadas en este transcrito primario, por lo que estas secuencias son removidas por un mecanismo específico de procesamiento del ARN ribosómico y sólo después de estas modificaciones pasan a formar parte del ribosoma (Bridge *et al.*, 2000; Atkins y Clark, 2004).



**Figura 2.** Arreglo de los genes de los ribosomas en los eucariotas incluyendo las dos secuencias espaciadoras internas (ITS) (Tomado de Bridge *et al.*, 2000).

Debido a que el cambio en las secuencias de los genes de ARNr es muy lento, la comparación de éstas puede ser utilizada para estudiar la evolución entre organismos distantemente relacionados, mientras que las regiones no codificantes, ITS e IGS, cambian rápidamente y son útiles para la comparación de especies de hongos dentro de un género o cepas dentro de una especie. Por este motivo, las regiones espaciadoras internas de transcripción de los ARN ribosómicos, ITS, surgen como un concepto en la biología molecular para la tipificación genética de microorganismos (Bridge *et al.*, 2000)

Las secuencias que constituyen los espaciadores ITS están codificadas por los (ADNr). Todos los organismos eucariotas tienen dos regiones ITS: La región ITS1 se encuentra ubicada entre el gen que codifica para el ARNr de 18S y el gen que codifica al ARNr de 5.8S y ITS2 que se ubica entre los genes de los ARNr ribosómicos de 5.8S y 28S (Figura 3) (Bridge *et al.*, 2000; Atkins y Clark, 2004).

Haciendo uso de dos cebadores, partidores o “primers” específicos, que son oligonucleótidos que inician la síntesis de ADN *in vitro*, llamados ITS1 e ITS4, se puede amplificar la región comprendida entre ITS1, 5.8S ADNr e ITS2, la cual varía en longitud, dependiendo de la especie (White *et al.*, 1990).

La región ITS es quizás ahora el fragmento de ADN más secuenciado en los hongos. Esta región ha sido muy útil en estudios de sistemática molecular a nivel de especie y aún dentro de las especies. Por ejemplo, se ha utilizado en la clasificación de las especies de *Colletotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., entre otros (Edel *et al.*, 1996; Screenivasaprasad *et al.*, 1996; Liew *et al.*, 1998; Stanley *et al.*, 1998; Suga *et al.*, 2000; Burgess *et al.*, 2006). La región ITS, se

ha utilizado para diferenciar aislados de hongos de diferentes frutas tropicales como el mango *Mangifera indica* L., parcha *Passiflora edulis* L, tamarillo *Cyphomandra betacea* L, mora de castilla *Rubus glaucus* L y frutas como fresa *Fragraria vesca* L y cítricos (Afanador-Kafuri *et al.*, 2002; Rivera – Vargas *et al.*, 2006; Marulanda *et al.*, 2007).

### **3.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés)**

Ésta técnica fue ideada por Kary B. Mullis en 1985, permite multiplicar *in vitro* una región específica del ADN hasta más de un millón de veces. La PCR es una reacción enzimática en cadena que conlleva la amplificación de secuencias de un ADN en específico, produciendo muchas copias de un segmento determinado. El material inicial para la PCR es una solución de doble hebra de ADN. Se necesitan los primers que son de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, sintetizados químicamente y consisten de secuencias complementarias al ADN molde. Éstas se requieren para que la ADN polimerasa inicie la síntesis de ADN. La amplificación se realiza en presencia de nucleótidos (dNTPs) como el sustrato y la ADN polimerasa cual cataliza la reacción. La hebra de ADN es separada por calor (más de 90 °C) y el ADN es desnaturalizado. El cambio de temperatura (65°C) permite a los primers enlazar por puentes de hidrógeno al final de la secuencia blanco. La ADN polimerasa extiende los “primers” por adición de nucleótidos y la secuencia blanco queda doblada. La nueva secuencia sintetizada es ahora disponible para el siguiente ciclo, es así que teóricamente por cada ciclo ocurrido la concentración de ADN se duplica y pasados 30 ciclos el rendimiento de una secuencia específica es de  $1 \times 10^9$  copias. El PCR alcanza estos resultados debido a que la reacción

en cadena requiere el alineamiento específico de los dos primers a la secuencia complementaria (Costa, 2004; Burrel, 1993; Atkins y Clark, 2004)

El desarrollo de la técnica de PCR y el diseño de oligonucleótidos cebadores de la síntesis *in vitro* de ADN ha conducido a la amplificación de varias regiones del ADNr para su análisis taxonómico. La PCR ha permitido el análisis de un pequeño número de células fúngicas y aún de una sola espora. La primera vez que se utilizó este tipo de análisis en micología, consistió en la amplificación y secuenciación del ADNr, estableciéndose relaciones filogenéticas de hongos (Bridge *et al.*, 2000).

Uno de los aspectos más relevantes en el desarrollo de esta metodología fue el diseño de los “primers”, los cuales fueron elaborados a partir de regiones conservadas. Ello permitió la amplificación de los fragmentos del ADNr en la mayoría de los hongos, conduciendo al desarrollo de los estudios taxonómicos y filogenéticos entre una especie y otra y dentro de la misma especie. Posteriormente, mediante la técnica de PCR y secuenciación o PCR asociado a polimorfismos de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), junto con la elaboración de otros primers específicos se ha podido desarrollar metodologías eficientes en la identificación de hongos. Muchos investigadores han secuenciado las regiones correspondientes al ADNr de muchas especies fúngicas, que incluyen los genes de los ARNr 18S, 5.8S, 28S y las dos regiones ITS, incorporándose esa información en las bases de datos de secuencias de nucleótidos de dominio público (GenBank). La información disponible indica el tamaño de la región comprendida entre cada ITS (1 ó 2) la cual es específica para cada especie (Bridge *et al.*, 2000).

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1 Área de Estudio.**

Se seleccionaron árboles de rambután y longán provenientes de diferentes localidades en Puerto Rico. Los muestreos del material vegetal se llevaron a cabo durante el período comprendido entre los meses de agosto a septiembre de 2008 y marzo y abril de 2009 durante la época de floración y producción de ambos frutales exóticos. Los muestreos se realizaron en huertos experimentales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos – Servicio de Investigación Agrícola (USDA – ARS, por sus siglas en inglés), en las Subestaciones Experimentales Agrícolas (EEA) de Corozal y Adjuntas pertenecientes a la Universidad de Puerto Rico, las cuales están ubicadas en las regiones noroeste y centro de la isla; tres fincas de frutales comerciales ubicadas en Mayagüez, Juana Díaz y el poblado Castañer de Lares; un jardín comercial ubicado en Cabo Rojo y la Estación de Investigación en Agricultura Tropical (TARS) del USDA - ARS ubicadas en Isabela y Mayagüez (Fig. 3).

### **4.2 Recolección del material vegetal.**

Se recolectó material vegetal sintomático y asintomático de hojas, frutos, corteza e inflorescencias de árboles de longán y rambután. Se colocó en bolsas plásticas debidamente rotuladas y se transportó en una nevera portátil al Laboratorio de Fitopatología ubicado en la Universidad de Puerto Rico, Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales del Recinto Universitario de Mayagüez.

**Figura 3.** Localización de los lugares de muestreo de material vegetal de frutales exóticos tropicales rambután y longán en Puerto Rico.



Fuente: <http://www.uprm.edu/agricultura/sea/mapa/mapa2007.jpg>

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 1. EEA Corozal                     | 5. Finca comercial en el poblado Castañer de Lares |
| 2. Finca comercial en Mayagüez     | 6. EEA. Adjuntas                                   |
| 3. TARS, Mayagüez                  | 7. TARS, Isabela                                   |
| 4. Jardines comercial en Cabo Rojo | 8. Finca comercial en Juana Díaz                   |

### **4.3 Aislamiento de hongos asociados a frutales exóticos tropicales**

Se realizaron cortes (1 mm) del tejido vegetal sintomático y asintomático provenientes del campo. El tejido cortado se desinfectó superficialmente con etanol al 70%, una solución de hipoclorito de sodio al 0.05% y un enjuague con agua destilada estéril (ADE), por un período de 1 minuto por cada tratamiento. El tejido desinfectado se transfirió a placas petri con agar de papa y dextrosa acidulado con ácido láctico al 25% (APDA). Además, se utilizaron los siguientes medios de cultivos para inducir esporulación de los aislados de hongos obtenidos: agar con hojas de clavel (CLA), agar de agua con tallos de rambután (TRA), agar de agua (WA), agar de avena (OA), agar de malta (MA) y agar de harina de maíz (CMA). Los aislados fueron incubados a 26°C por 6 días. Los cultivos se purificaron y se realizaron cultivos monospóricos para proceder a su identificación utilizando los criterios morfológicos establecidos en las claves taxónomicas y realizar análisis de DNA.

### **4.4 Caracterización de aislados de rambután y longán**

#### **4.4.1 Características morfológicas**

Se caracterizaron los aislados de hongos en base a sus características morfológicas tales como: color y forma del micelio, producción de estructuras reproductivas en medio de cultivo, tamaño y forma de la conidia, entre otras. Para la descripción morfológica de la conidias, se utilizó microscopía de luz y microscopía electrónica de rastreo (SEM).

Para caracterizar los aislados mediante microscopía de luz, se observaron macroscópicamente las colonias mediante un microscopio estereoscopio (Leica, Modelo

Zoom 2000) y microscópicamente en un microscopio compuesto (Olympus, Modelo 40BX, Melville, NY), calibrado a una magnificación de 40X. Macroscópicamente se observó el color de las colonias y la formación de las estructuras reproductivas de los aislados. Para caracterizarlos microscópicamente, se suspendió el micelio de las colonias en 10 ml de agua estéril y se mezcló en un agitador (Vortex Fisher-Genie2®, Ontario, Canadá). De la suspensión del micelio, se prepararon laminillas semipermanentes, se observaron y se midieron 50 conidias al azar (largo y ancho) para examinar detalladamente las estructuras reproductivas de los diferentes aislados encontrados.

Para observar las conidias mediante el SEM, se colocó papel filtro cortado en trozos de 1mm<sup>2</sup> sobre el medio de cultivo. Los trozos de papel filtro que tenían crecimiento micelial fueron colectados y suspendidos por un periodo de 24 horas en una solución fijadora de glutaraldehído al 3%. Estos trozos fijados fueron deshidratados en soluciones de alcohol etílico que fluctuaron del 5% hasta el 99% por intervalos de 20 minutos, incrementando 10% de la concentración del alcohol. Una vez deshidratadas las muestras, fueron secadas en su punto crítico y cubiertas con una lámina de oro. Estos últimos dos procedimientos se realizaron en el centro de microscopía del Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.

Se utilizaron diversas claves morfológicas para la clasificación de las diferentes especies (Booth y Ting, 1964; Zalasky *et al.*, 1971; Wiley y Simmons, 1971; Santos-Flóres y Betancourt-López, 1987; Crous *et al.*, 1993; Rossman *et al.*, 1993; Hanlin, 1997; Barnett y Hunter, 1998; Rossman *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2001; Nishijima *et al.*, 2001; Crous *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2005; Slippers *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2006; Crous *et al.*, 2006; Decock *et al.*, 2006; Leslie y Summerell, 2006;

Ploetz, 2007; Rossman *et al.*, 2007; Simmons, 2007; Lombard *et al.*, 2009 y 2010).

#### **4.4.2 Caracterización molecular**

##### **4.4.2.1 Extracción y análisis de ADN**

Para la extracción de ADN genómico de los hongos asociados a rambután y longán, se utilizó el Kit de extracción de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la extracción del ADN genómico, se utilizaron diferentes métodos para caracterizar molecularmente los aislados. Se utilizó PCR para amplificar la región ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2, utilizando los primers ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), e ITS4 (5' TCC CTT TCA ACA ATT TCA CG-3') descritos por White *et al.*, 1990. Se utilizaron los primers específicos *CgInt* (5'GGC CTC CCG CCG GGC GG-3') y *CaInt2* (5'GGG GAA GCC TCT CGC GG-3') para caracterizar especies de *Colletotrichum* (Brown *et al.*, 1996) y los primers específicos CAMEL2 (5' AGT ATA CAA AAC TCA AGA ATT C-3') y CITRIC1 (5' GAA AGG TGA TGG AAG GGA G-3') para caracterizar especies de *Guignardia* (Meyer *et al.*, 2006).

El volumen total de la reacción del PCR fue de 50  $\mu$ L. Comprendía una mezcla de 25  $\mu$ L Amplitaq Gold® PCR Master Mix (Roche, New Jersey USA) siguiendo instrucciones del fabricante, 12 pmol de cada primer, 17  $\mu$ L de agua ultra pura (Sigma), 20 a 30 ng de DNA. La amplificación se realizó utilizando un termociclador Perkin Elmer 2400. La reacción de PCR para los primers ITS1 e ITS4 consistió de una desnaturalización a 94°C por 4 minutos, una hibridización a 55°C por 30 segundos, una extensión a 72°C por 1 minuto, con 35 ciclos, seguido de una extensión final a 72°C por 4 minutos (Konstantinova *et al.*, 2002; White *et al.*, 1990). La reacción para los primers específicos *CaInt2* y *CgInt* de *Colletotrichum* consistió de una desnaturalización inicial a

95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 95°C por 45 segundos, 55°C por 75 segundos para *CgInt* o 69 °C por 75 segundos para *CaInt2* y una extensión final a 72 °C por 5 minutos (Brown *et al.*, 1996). La reacción para los primers específicos CAMEL2 y CITRIC1 para especies de *Guignardia* consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 93°C por 30 segundos, seguido de una hibridación a 56°C por 45 segundos, una extensión a 72°C por 90 segundos y una extensión final de 72°C por 7 minutos (Meyer *et al.*, 2006).

Se visualizaron los productos de PCR mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1.4% preparada con un amortiguador de Borato de Sodio (SB) y 4 µl de bromuro de etidio (1µg/1µl, Sigma®, St. Louis, MO). Se visualizó el gel de agarosa en un iluminador de rayos ultravioleta (BioRad Laboratory, Inc., Japón) con el programa (Quantity One®, Versión 4.5 del 2003) y se documentó fotográficamente. El producto de PCR fue purificado con el Kit comercial de QIAGEN (QIA quick PCR purification, CA) y secuenció en las facilidades de secuenciación y genotipificación, ubicadas en el Departamento de Biología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Río Piedras. Las secuencias fueron editadas y alineadas con el programa Sequencher® 4.9 (Gene codes Corporation, Minnesota, USA). Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GenBank del Centro National para Información Biotecnológica (NCBI o National Center for Biotechnology Information), mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para determinar su homología con otras especies. Una vez las secuencias fueron editadas y alineadas se depositaron en el GenBank y se obtuvo un número de acceso (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Número de accesión de las secuencias depositadas en el GenBank de los diferentes aislados de hongos encontrados en frutales exóticos tropicales en Puerto Rico.

<b>Hongo</b>	<b>Aislado</b>	<b>No. Accesión GenBank</b>
<i>Alternaria alternata</i>	193.IV	GU797361
<i>Alternaria alternata</i>	203.II	GU797362
<i>Alternaria alternata</i>	210.IV	GU797363
<i>Alternaria alternata</i>	219.II	GU797364
<i>Alternaria tenuissima</i>	269.I	GU797365
<i>Alternaria tenuissima</i>	286.II	GU797366
<i>Beltrania rhombica</i>	16.I	GU797390
<i>Botryosphaeria parva</i>	132.V	GU797367
<i>Botryosphaeria parva</i>	221.IV	GU797368
<i>Botryosphaeria parva</i>	231.I	GU797369
<i>Botryosphaeria parva</i>	290.IV	GU797370
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	46.II	GU797371
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	58.I	GU797372
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	60.I	GU797373
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	61.I	GU797374
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	61.III	GU797375
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	62.I	GU797376
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	71.III	GU797377
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	71	GU797378
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	74.II	GU797379
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	81.I	GU797380
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	81.II	GU797381
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	127.I	GU797382
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	146.III	GU797383
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	159.I	GU797384
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	161.II	GU797385
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	189.II	GU797386
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	228.I	GU797387
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	282.I	GU797388
<i>Botryosphaeria ribis</i>	251.I	GU797389
<i>Calonectria pseudospathiphylli</i>	7.III	GU797396
<i>Calonectria pseudospathiphylli</i>	7.IV	GU797397
<i>Cryphonectria cubensis</i>	6.III	GU797395
<i>Bipolaris oryzae</i>	262.I	GU797393
<i>Bipolaris oryzae</i>	223.IV	GU797391
<i>Bipolaris oryzae</i>	238.VII	GU797392
<i>Fusarium</i> sp.	62.IV	GU797398
<i>Fusarium</i> sp.	218.III	GU797401
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	48.IV	GU797410
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	229.II	GU797411
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	187.I	GU797399

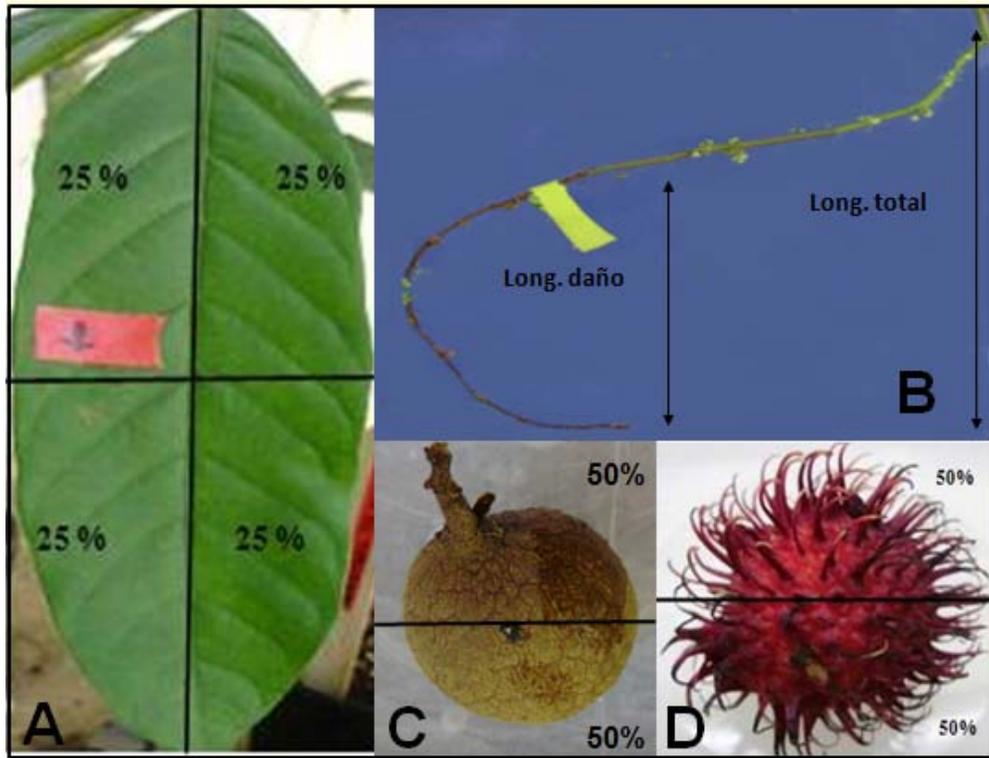
**Cuadro 2.** Número de accesión de las secuencias depositadas en el GenBank de los diferentes aislados de hongos encontrados en frutales exóticos tropicales en Puerto Rico (continuación).

<b>Hongo</b>	<b>Aislado</b>	<b>No. Accesión GenBank</b>
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	218.II	GU797402
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	245.VII	GU797403
<i>Fusarium culmorum</i>	245.VI	GU797400
<i>Glomerella cingulata</i>	19.II	GU797394
<i>Guignardia mangiferae</i>	220.II	GU797404
<i>Lasmenia</i> sp.	68.IV	GU797405
<i>Lasmenia</i> sp.	278.II	GU797406
<i>Lasmenia</i> sp.	278.III	GU797407
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	193.I	GU797408
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	220.IV	GU797409
<i>Leuconectria clusiae</i>	7.I	GU299862
<i>Nigrospora oryzae</i>	151.V	GU797412
<i>Nigrospora oryzae</i>	186.V	GU797413
<i>Nigrospora oryzae</i>	229.III	GU797414
<i>Nigrospora oryzae</i>	260.III	GU797415
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	158.IV	GU797416
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	236.V	GU797417
<i>Phoma</i> spp.	184.V	GU797418
<i>Phoma</i> spp.	185.II	GU797419
<i>Phoma</i> spp.	234.IV	GU797420
<i>Phoma</i> spp.	237.I	GU797421
<i>Phoma</i> spp.	239.I	GU797422
<i>Phoma</i> spp.	241.I	GU797423
<i>Phoma</i> spp.	263.III	GU797424
<i>Phoma</i> spp.	264.IV	GU797425
<i>Phoma</i> spp.	288.IV	GU797426
<i>Phoma</i> spp.	298.III	GU797427
<i>Phomopsis longicolla</i>	135.III	GU797428
<i>Phomopsis longicolla</i>	153.IV	GU797429
<i>Phomopsis longicolla</i>	262.III	GU797431
<i>Phomopsis liquidambari</i>	260.I	GU797430
<i>Sordaria fimicola</i>	10.II	GU797441
<i>Xylaria hypoxylon</i>	213.I	GU797432
<i>Xylaria venosula</i>	246.IV	GU797433
<i>Xylaria</i> sp.	273.V	GU797435
<i>Xylaria enteroleuca</i>	277.III	GU797436
<i>Xylaria hypoxylon</i>	277.IV	GU797437
<i>Xylaria venosula</i>	279.IV	GU797438
<i>Xylaria hypoxylon</i>	281.I	GU797439
<i>Xylaria enteroleuca</i>	289.IV	GU797440
<i>Xylaria venosula</i>	270.III	GU797434

#### 4.4.3 Pruebas de patogenicidad

Se realizaron pruebas de patogenicidad en hojas, flores y frutos de rambután durante los días 11, 14 y 27 de agosto de 2009, respectivamente. Las inoculaciones en flores y frutos de longán se realizaron el día 28 de agosto de 2009.

Para las pruebas en hojas, se sembraron semillas de los frutales exóticos y se mantuvieron en el invernadero del Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Las semillas se colocaron en bolsas plásticas con una mezcla de Promix ® y composta en una relación 1:1. Para las pruebas de patogenicidad se utilizaron 27 arbolitos de aproximadamente 6 meses de edad de los frutales exóticos. Previo a las inoculaciones, las hojas se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0.05% y un lavado con agua destilada estéril (ADE) por 1 minuto y luego se inocularon con los diferentes hongos aislados. Se utilizaron cuatro hojas por cada arbolito, dos hojas para la prueba con incisión y dos más para la prueba sin incisión, para un total de 108 hojas inoculadas. En el punto de inoculación se preparó una cámara húmeda utilizando bolsas plásticas y algodón con ADE. El inóculo se aplicó con una suspensión de conidias ( $10^6$  conidias/ml) o con discos de agar de micelio de 5 mm de diámetro. Para medir el porcentaje de severidad, dividió la hoja en 4 cuadrantes cada uno de 25% del área total. Para cada hongo evaluado, se determinó el porcentaje de tejido cubierto y se estimó el daño visualmente (Fig. 4A).



**Figura 4.** Medida del porcentaje de severidad de la enfermedad en frutales exóticos tropicales. (A) Hojas, (B) Inflorescencias, (C) Fruto de longán y (D) Fruta de rambután.

Para las pruebas de patogenicidad en flores y frutas se utilizó el proceso de desinfestación superficial descrito anteriormente. Para la inoculación en flores, se utilizaron inflorescencias asintomáticas *in vivo* en árboles de rambután y longán localizados en TARS, Isabela. En el punto de inoculación se preparó una cámara húmeda utilizando bolsas plásticas y ADE. El inóculo se aplicó con una suspensión de conidias ( $10^6$  conidias/ml) o con discos de micelio de 5 mm. de diámetro. Se utilizó una inflorescencia por cada aislado y se inoculó una raquilla por cada tratamiento, con un total de 15 inflorescencias con 4 puntos de inoculación. Se midió el porcentaje de

severidad tomando el largo de la raquilla con respecto al largo de la lesión en el tejido vegetal (Fig. 4B).

Para las pruebas en frutos, se utilizaron frutos asintomáticos cortados en el campo. Las frutas se colocaron en cámaras húmedas preparadas en cajas plásticas (30 x 15 x 10 cm) previamente desinfectadas con alcohol etílico al 95% y papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. Se utilizaron dos frutas por cada caja plástica, con y sin incisión. Las frutas de rambután o longán, fueron inoculadas según lo antes descrito con los hongos seleccionados. Para medir el porcentaje de severidad, cada fruta se dividió en 2 cuadrantes de 50% y se midió el área de la lesión en el tejido vegetal (Fig. 4C y 4D).

Se tomaron datos de la sintomatología observada, tamaño de la lesión y porcentaje de severidad de 3 días hasta 8 días después de la inoculación de cada hongo y se completaron los postulados de Koch para cada aislado evaluado.

A continuación se presentan los géneros y aislados de hongos evaluados en los diferentes órganos de los frutales tropicales exóticos (rambután y longán) Cuadro 3 y 4.

**Cuadro 3.** Géneros y aislados de hongos de diferentes órganos de rambután, *N. lappaceum* inoculados con disco de micelio (5 mm. de diámetro) y suspensión de esporas (conidias /ml) en tratamientos con y sin herida.

PATÓGENO	AISLADO	TRATAMIENTO	PARTE INOCULADA
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	48.IV	0.76X10 <sup>6</sup> (1)	Flor
		0.76X10 <sup>6</sup> (2)	Flor
		Disco micelio (3)	Flor
		Disco micelio (4)	Flor
<i>Alternaria alternata</i>	269.I	Disco micelio (1)	Hoja
		Disco micelio (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	46.II	Disco micelio (1)	Hoja
		Disco micelio (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	289.V	Disco micelio (1)	Flor
		Disco micelio (2)	Flor
		Disco micelio (3)	Flor
		Disco micelio (4)	Flor
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	71.V	Disco micelio (1)	Fruta
	158.I	Disco micelio (2)	Fruta
		Disco micelio (1)	Fruta
		Disco micelio (2)	Fruta
<i>Calonectria pseudospathiphylli</i>	7.III	Disco micelio (1)	Fruta
	7.IV	Disco micelio (2)	Fruta
		Disco micelio (1)	Fruta
		Disco micelio (2)	Fruta
<i>Fusarium chlamyosporum</i>	218.II	1.04X10 <sup>6</sup> (1)	Fruta
		1.04X10 <sup>6</sup> (2)	Fruta
<i>Fusarium chlamyosporum</i>	68.I	1.04X10 <sup>6</sup> (1)	Flor
		1.04X10 <sup>6</sup> (2)	Flor
		Disco micelio (3)	Flor
		Disco micelio (4)	Flor
<i>Glomerella cingulata</i>	147.IV	1.47X10 <sup>6</sup> (1)	Hoja
		1.47X10 <sup>6</sup> (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Glomerella cingulata</i>	151.III	2.06X10 <sup>6</sup> (1)	Hoja
		2.06X10 <sup>6</sup> (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Glomerella cingulata</i>	147.II	1.87X10 <sup>6</sup> (1)	Fruta
	151.II	1.87X10 <sup>6</sup> (2)	Fruta
		1.23X10 <sup>6</sup> (1)	Fruta
		1.23X10 <sup>6</sup> (2)	Fruta
<i>Guignardia mangiferae</i>	220.II	Disco micelio (1)	Hoja
		Disco micelio (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja

(1 y 4) Tratamientos con herida

(2 y 3) Tratamientos sin herida

**Cuadro 3.** Géneros y aislados de hongos de diferentes órganos de rambután, *N. lappaceum* inoculados con disco de micelio (5 mm. de diámetro) y suspensión de esporas (conidias /ml) en tratamientos con y sin herida (Continuación).

PATÓGENO	AISLADO	TRATAMIENTO	PARTE INOCULADA
<i>Lasmenia</i> sp.	2.II	1.87X10 <sup>6</sup> (1)	Hoja
		1.87X10 <sup>6</sup> (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Lasmenia</i> sp.	3.II	3.80X10 <sup>6</sup> (1)	Hoja
		3.80X10 <sup>6</sup> (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Lasmenia</i> sp.	265.I	4.50X10 <sup>6</sup> (1)	Hoja
		4.50X10 <sup>6</sup> (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Lasmenia</i> sp.	300.I	1.99X10 <sup>6</sup> (1)	Flor
		1.99X10 <sup>6</sup> (2)	Flor
		Disco micelio (3)	Flor
		Disco micelio (4)	Flor
<i>Lasmenia</i> sp.	278.II	3.46X10 <sup>6</sup> (1)	Fruta
		3.46X10 <sup>6</sup> (2)	Fruta
	275.II	2.48X10 <sup>6</sup> (1)	Fruta
		2.48X10 <sup>6</sup> (2)	Fruta
<i>Leuconectria clusiae</i>	7.I	1.02X10 <sup>6</sup> (1)	Fruta
		1.02X10 <sup>6</sup> (2)	Fruta
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	75.II	2.75X10 <sup>6</sup> (1)	Hoja
		2.75X10 <sup>6</sup> (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	301.II	0.96 X10 <sup>6</sup> (1)	Flor
		0.96X10 <sup>6</sup> (2)	Flor
		Disco micelio (3)	Flor
		Disco micelio (4)	Flor
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	305.II	1.56 X10 <sup>6</sup> (1)	Fruta
		1.56 X10 <sup>6</sup> (2)	Fruta
	79.V	2.04 X10 <sup>6</sup> (1)	Fruta
		2.04 X10 <sup>6</sup> (2)	Fruta
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	75.V	1.20X10 <sup>6</sup> (1)	Hoja
		1.20X10 <sup>6</sup> (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	77.V	1.04X10 <sup>6</sup> (1)	Hoja
		1.04X10 <sup>6</sup> (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja
<i>Phoma</i> spp.	236.IV	Disco micelio (1)	Hoja
		Disco micelio (2)	Hoja
		Disco micelio (3)	Hoja
		Disco micelio (4)	Hoja

(1 y 4) Tratamientos con herida

(2 y 3) Tratamientos sin herida

**Cuadro 3.** Géneros y aislados de hongos de diferentes órganos de rambután, *N. lappaceum* inoculados con disco de micelio (5 mm. de diámetro) y suspensión de esporas (conidias /ml) en tratamientos con y sin herida (Continuación).

<b>PATÓGENO</b>	<b>AISLADO</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PARTE INOCULADA</b>
<i>Phoma</i> spp.	264.IV	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phoma</i> spp.	264.IV	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Phomopsis longicolla</i>	274.III	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phomopsis longicolla</i>	153.II	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phomopsis longicolla</i>	150.III	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phomopsis longicolla</i>	148.II	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phomopsis longicolla</i>	300.V	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Phomopsis longicolla</i>	66.III 175.III	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (1) Disco micelio (2)	Fruta Fruta Fruta Fruta
<i>Phomopsis longicolla</i>	153.V	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja

(1 y 4) Tratamientos con herida  
(2 y 3) Tratamientos sin herida

**Cuadro 4.** Géneros y aislados de hongos de diferentes órganos de longán, *D. longan* inoculados con disco de micelio (5 mm. de diámetro) en tratamientos con y sin herida.

PATÓGENO	AISLADO	TRATAMIENTO	PARTE AFECTADA
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	229.II	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Alternaria alternata</i>	170.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Botryosphaeria parva</i>	221.IV	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Botryosphaeria parva</i>	250.V	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	81.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	81.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Fruto Fruto Fruto Fruto
<i>Botryosphaeria ribis</i>	251.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	187.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Fusarium culmorum</i>	245.VI	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Glomerella cingulata</i>	165.II	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Glomerella cingulata</i>	171.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja

(1 y 4) Tratamientos con herida

(2 y 3) Tratamientos sin herida

**Cuadro 4.** Géneros y aislados de hongos de diferentes órganos de longán, *D. longan* inoculados con disco de micelio (5 mm. de diámetro) en tratamientos con y sin herida (Continuación).

PATÓGENO	AISLADO	TRATAMIENTO	PARTE AFECTADA
<i>Glomerella cingulata</i>	246.II	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	227.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	228.III	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	236.V	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	236.V	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Fruto Fruto Fruto Fruto
<i>Phoma</i> spp.	234.IV	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phoma</i> spp.	241.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phoma</i> spp.	237.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Phoma</i> spp.	236.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Phomopsis liquidambari</i>	179.II	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja

(1 y 4) Tratamientos con herida

(2 y 3) Tratamientos sin herida

**Cuadro 4.** Géneros y aislados de hongos de diferentes órganos de longán, *D. longan* inoculados con disco de micelio (5 mm. de diámetro) en tratamientos con y sin herida (Continuación).

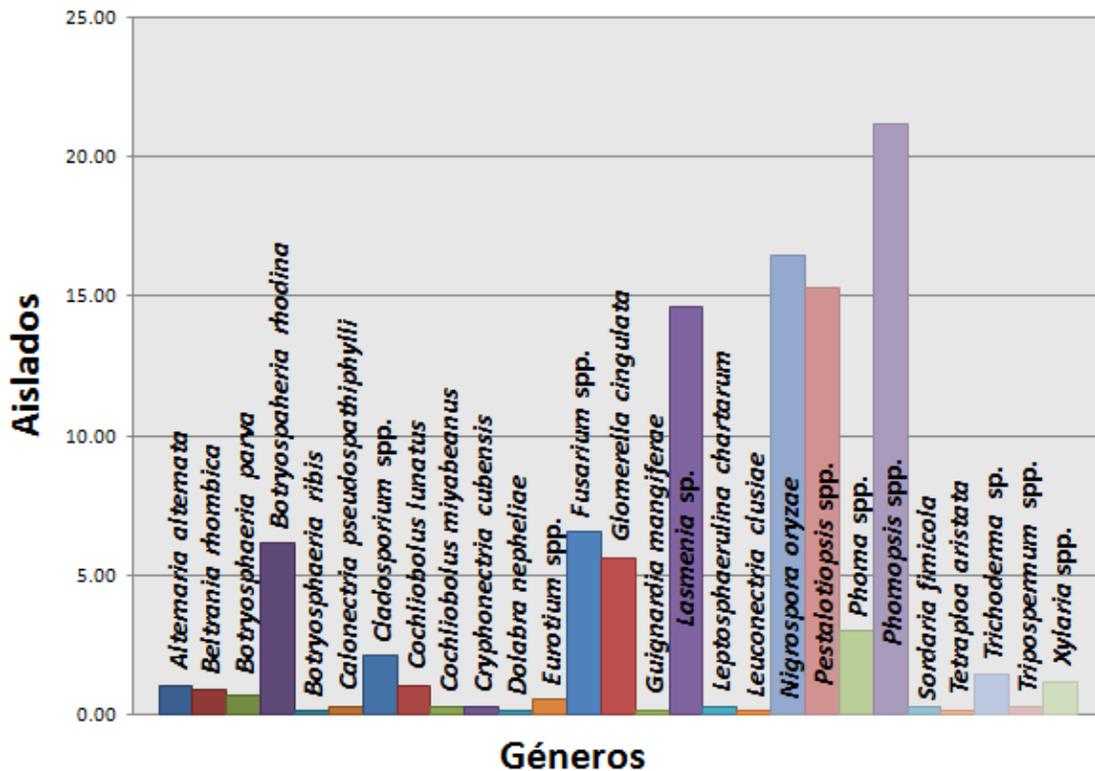
PATÓGENO	AISLADO	TRATAMIENTO	PARTE AFECTADA
<i>Phomopsis liquidambari</i>	263.III	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phomopsis liquidambari</i>	274.IV	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Hoja Hoja Hoja Hoja
<i>Phomopsis liquidambari</i>	300.V	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor
<i>Phomopsis liquidambari</i>	260.I	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Fruto Fruto Fruto Fruto
<i>Xylaria</i> sp.	246.IV	Disco micelio (1) Disco micelio (2) Disco micelio (3) Disco micelio (4)	Flor Flor Flor Flor

(1 y 4) Tratamientos con herida  
(2 y 3) Tratamientos sin herida

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Recolección del material vegetal y aislamiento de hongos asociados a rambután y longán.

Se obtuvieron un total de 765 aislados de hongos asociados a rambután y longán, en las ocho localidades muestreadas durante el período comprendido entre agosto a septiembre de 2008 y abril a mayo de 2009 (Cuadro 5). El 75.2 % de los aislados correspondieron a rambután y el 24.8% a longán. Se identificaron un total de 27 géneros de hongos, de los cuales 17 géneros pertenecen al filum Ascomycota y 10 corresponden a hongos mitospóricos (Fig. 5).



**Figura 5.** Distribución de géneros de hongos asociados a rambután y longán en Puerto Rico.

Los géneros más frecuentes fueron *Phomopsis* spp. (21.2%), *Nigrospora oryzae* (16.5%) y *Pestalotiopsis* spp. (15.3%), obtenidos de hojas, inflorescencias, cortezas y frutos de rambután y longán. Un 14.6% de los aislados corresponde al género *Lasmenia* sp., encontrándose en hojas, inflorescencias y frutos de rambután. En menor proporción se obtuvieron *Fusarium* spp., *Botryosphaeria rhodina* y *Glomerella cingulata*, de hojas, inflorescencias, corteza y frutos de rambután y longán con 6.5, 6.2 y 5.6%, respectivamente (Cuadro 5). Aunque son pocos los aislados encontrados de *Leuconectria clusiae*, *Dolabra nepheliae*, y *Eurotium* sp., éstos han sido reportados como patógenos de rambután (Ploetz, 2003; USDA, 2005; Rossman et al., 2007). *Tetraploa aristata*, *Tripospermum variabile* y *T. porosporiferum* han sido reportado en la isla como hifomicetes acuáticos (Santos-Flores y Betancourt-López, 1987). Estos géneros fueron obtenidos en una finca comercial ubicada en Lares y un jardín comercial ubicado en Cabo Rojo. Los frutos de longán estaban cubiertos por un crecimiento micelial oscuro y fueron colectados de árboles localizados cercanos a un cuerpo de agua (lago y canal de riego).

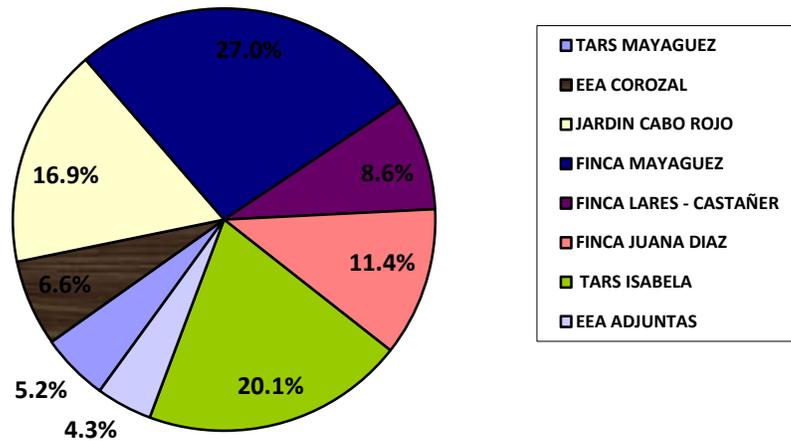
**Cuadro 5.** Distribución de especies de hongos encontrados en rambután, *Nephelium lappaceum* y longán, *Dimocarpus longan*.

HONGO	No. AISLADOS	PORCENTAJE	PLANTA	ESTRUCTURA AFECTADA
<i>Alternaria alternata</i>	8	1.05	Rambután, longán	Hojas y frutos inmaduros
<i>Beltrania rhombica</i>	7	0.92	Rambután	Hojas, inflorescencias y frutos
<i>Botryosphaeria parva</i>	5	0.65	Longán	Inflorescencia
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	47	6.14	Rambután, longán	Hojas, inflorescencias, corteza y fruto
<i>Botryosphaeria ribis</i>	1	0.13	Longán	Inflorescencia
<i>Calonectria pseudospathipylli</i>	2	0.26	Rambután	Fruto
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	16	2.09	Rambután, longán	Fruto
<i>Cochliobolus lunatus</i>	8	1.05	Rambután, longán	Inflorescencia
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	2	0.26	Rambután, longán	Hoja e inflorescencia
<i>Cryphonectria cubensis</i>	2	0.26	Rambután	Fruto
<i>Dolabra nepheliae</i>	1	0.13	Rambután	Corteza
<i>Eurotium spp.</i>	4	0.52	Rambután	Fruto
<i>Fusarium chlamydosporum</i> <i>Albonectria rigidiuscula</i> <i>Fusarium culmorum</i>	50	6.54	Rambután, longán	Inflorescencia y frutos
<i>Glomerella cingulata</i>	43	5.62	Rambután, longán	Hojas, inflorescencias y frutos
<i>Guignardia mangiferae</i>	1	0.13	Rambután	Fruto inmaduro apariencia sana
<i>Lasmenia spp.</i>	112	14.64	Rambután	Hojas, Inflorescencia y frutos
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	2	0.26	Rambután, longán	Inflorescencias y frutos
<i>Leuconectria clusiae</i>	1	0.13	Rambután	Fruto

**Cuadro 5.** Distribución de especies de hongos encontrados en rambután *Nephelium lappaceum* y longán *Dimocarpus longan* (Continuación).

<b>HONGO</b>	<b>No. AISLADOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>	<b>PLANTA</b>	<b>ESTRUCTURA AFECTADA</b>
<i>Nigrospora oryzae</i>	126	16.47	Rambután, longán	Hoja, inflorescencia y fruto
<i>Pestalotiopsis virgatula</i> <i>Pestalotiopsis clavispora</i>	117	15.29	Rambután, longán	Hoja, inflorescencia y frutos
<i>Phoma</i> spp.	23	3.01	Rambután, longán	Hoja e inflorescencia
<i>Phomopsis longicolla</i> <i>Phomopsis liquidambari</i>	162	21.18	Rambután, longán	Hojas, inflorescencias y frutos
<i>Sordaria humicola</i>	2	0.26	Longán	Hojas
<i>Tetraploa aristata</i>	1	0.13	Longán	Frutos
<i>Trichoderma</i> spp	11	1.44	Rambután, longán	Hojas
<i>Tripospermum variabile</i> <i>Tripopermum porosporiferum</i>	2	0.26	Longán	Fruto
<i>Xylaria venosula</i> <i>Xylaria enteroleuca</i> <i>Xylaria guareae</i>	15	1.18	Rambután, longán	Hojas e inflorescencias
<b>TOTAL</b>	765	100		

Los lugares de muestreo con mayor frecuencia de hongos aislados fueron la finca comercial ubicada en el Barrio El Limón del municipio de Mayagüez, TARS Isabela y el jardín comercial ubicado en Cabo Rojo con 27%, 20.1% y 16.9%, respectivamente. Las fincas comerciales ubicadas en Juana Díaz y Lares, TARS Mayagüez, las Estaciones Experimentales Agrícolas de Corozal y Adjuntas presentaron menor frecuencia de aislados de hongos (Fig. 6).



**Figura 6.** Frecuencia de aislados de hongos encontrados en rambután y longán en diferentes localidades de Puerto Rico.

La mayoría de géneros de hongos aislados se observaron en la finca del Barrio El Limón, 16 géneros de hongos diferentes se aislaron de tejido vegetal sintomático y asintomático de rambután y longán. En las fincas comerciales ubicadas en Juana Díaz y Lares, el jardín comercial ubicado en Cabo Rojo y TARS Isabela, a pesar de presentar variación en la cantidad de aislados, se obtuvo igual cantidad de géneros (Cuadro 6). Las EEA de Corozal y Adjuntas y TARS Mayagüez presentaron menor cantidad de géneros de hongos aislados (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Número de aislados y cantidad de géneros de hongos asociados a rambután y longán, encontrados en diferentes localidades de Puerto Rico.

ORIGEN <sup>1</sup>	PLANTA	No. AISLADOS	CANTIDAD GÉNEROS	GÉNEROS DE HONGOS
TARS (USDA- ARS) MAYAGÜEZ	Rambután	40	10	<i>B. rhombica</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. spathiphylli</i> , <i>C. cubensis</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>G. bulbilium</i> , <i>Lasmenia</i> sp., <i>P. clavispora</i> , <i>Phomopsis</i> sp., <i>S.fimicola</i>
EEA COROZAL	Rambután	51	6	<i>B. rhombica</i> , <i>Cladosporium</i> spp., <i>Lasmenia</i> sp., <i>Penicillium</i> spp., <i>P. clavispora</i> , <i>Phomopsis</i> sp.
JARDINES ENEIDA	Rambután Longán	130	12	<i>B. rhombica</i> , <i>B. rhodina</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. lunatus</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Lasmenia</i> sp., <i>N. oryzae</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>P. clavispora</i> , <i>Phomopsis</i> sp. <i>Tripospermum</i> spp.
PANORAMIC FRUIT	Rambután Longán	208	16	<i>A. alternata</i> , <i>B. rhodina</i> , <i>Cladosporium</i> spp., <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. lunatus</i> , <i>D. nepheliae</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Lasmenia</i> sp., <i>N. oryzae</i> , <i>P. clavispora</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Phomopsis</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp., <i>Xylaria</i> spp.
LA BALEAR	Rambután Longán	66	12	<i>B. rhodina</i> , <i>B. parva</i> , <i>B. ribis</i> , <i>B. oryzae</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>N. oryzae</i> , <i>P. clavispora</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Xylaria</i> sp.
MARTEX	Rambután	88	12	<i>A. alternata</i> , <i>B. rhodina</i> , <i>Cladosporium</i> spp., <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. lunatus</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>G. mangiferae</i> , <i>N. oryzae</i> , <i>Phomopsis</i> spp., <i>Xylaria</i> spp.
TARS (USDA – ARS) ISABELA	Rambután Longán	155	12	<i>A. alternata</i> , <i>B. rhodina</i> , <i>Cladosporium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Lasmenia</i> sp., <i>N. oryzae</i> , <i>P. clavispora</i> , <i>Phoma</i> spp., <i>Phomopsis</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.
EEA ADJUNTAS	Longán	33	10	<i>B. rhodina</i> , <i>B. parva</i> , <i>B. oryzae</i> , <i>Cladosporium</i> spp., <i>Fusarium</i> sp., <i>N. oryzae</i> , <i>P. clavispora</i> , <i>Phomopsis</i> spp., <i>S. fimicola</i>

<sup>1</sup>EEA= Estación Experimental Agrícola, TARS= Estación de Investigación en Agricultura Tropical, USDA. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. ARS. Servicio de investigación agrícola

## 5.2 Caracterización morfológica, molecular y patogénica de hongos asociados a rambután (*N. lappaceum*) y longán (*D. longan*)

### 5.2.1 Caracterización morfológica

#### 5.2.1.1 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

Se identificaron 8 aislados como *A. alternata*. En medio de cultivo APDA, la colonia produce micelio aéreo de color gris verdoso, conidias color pardo con septos transversales y longitudinales con un tamaño de 26 a 35  $\mu\text{m}$  de largo y 8 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho. En agar de papa y zanahoria (PCA) fueron observados un rango de 2 a 10 conidias en cadenas ramificadas a partir de conidióforos cortos con un tamaño de 40 a 70  $\mu\text{m}$  de largo (Simmons, 2007) (Fig. 7).

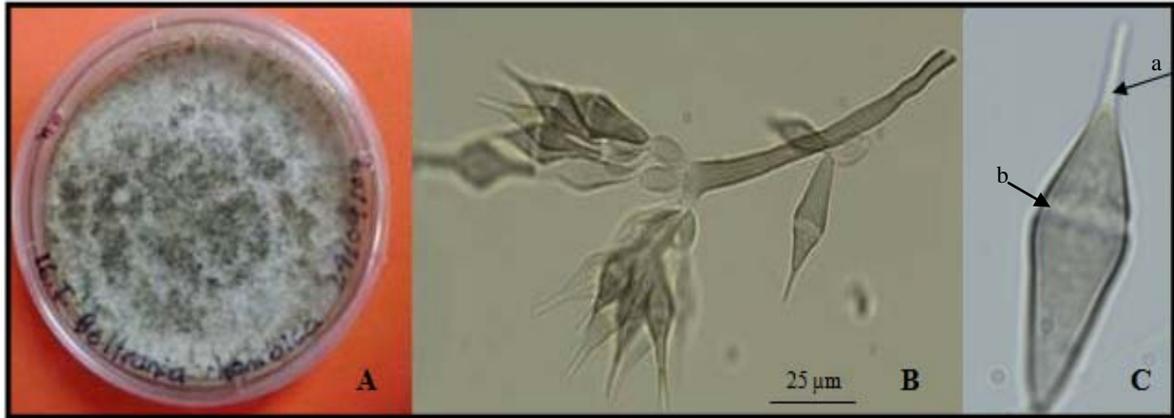


**Figura 7.** *Alternaria alternata* (A) Cultivo puro en APDA y (B) Conidias en cadena.

#### 5.2.1.2 *Beltrania rhombica* (Penz.)

Se identificaron 7 aislados como *B. rhombica*. En medio de cultivo APDA, la colonia produce micelio aéreo de color blanco con esporulación gris oscura. Las conidias son bicónicas de color café claro a oliva pálido y están arregladas en conidióforos simples, el tamaño promedio varía de 20 a 26  $\mu\text{m}$  de largo y 6 a 14  $\mu\text{m}$  de ancho. En el

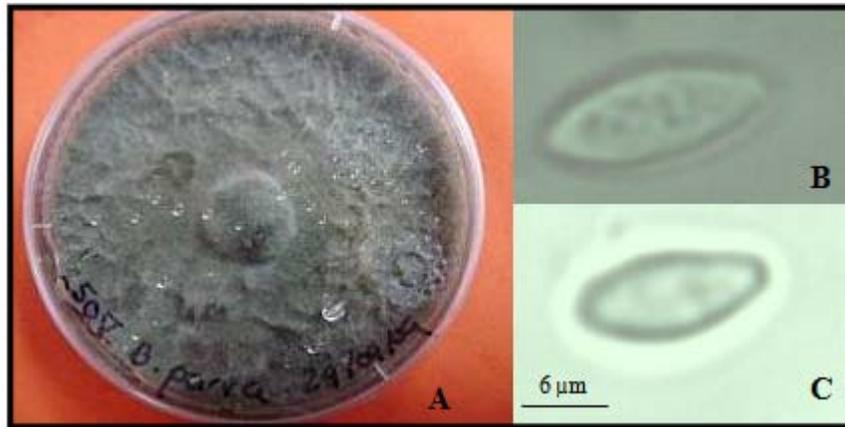
ápice de la conidia se observa un apéndice de 10 a 15  $\mu\text{m}$  de largo con una división en la base, en la parte media una banda transversal hialina y células ovoides en la base (Santos – Flores y Betancourt – López, 1987) (Fig. 8).



**Figura 8.** *Beltrania rhombica* (A) Cultivo puro en APDA, (B) Conidióforo y conidias y (C) Detalle de apéndice con división en la base (a) y banda transversal hialiana (b).

### 5.2.1.3 *Botryosphaeria parva* (Pennycook & Samuels)

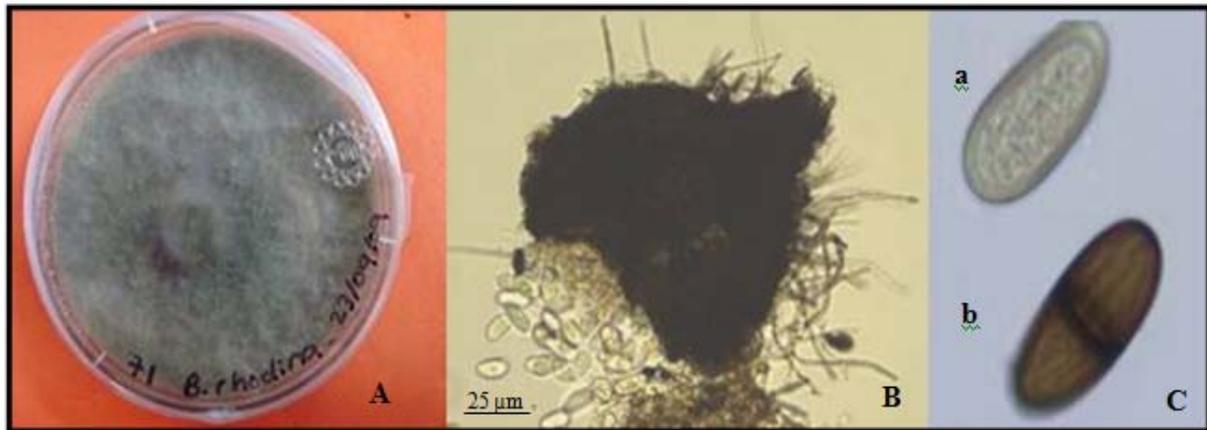
Se identificaron 5 aislados como *B. parva* en su estado anamorfo *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips. En APDA y OA la colonia fué color gris. Produce micelio aéreo con picnidios en el medio de cultivo de forma y tamaño irregular. Las conidias son hialinas, aseptadas, ovoides a elipsoides con un tamaño promedio de 11.5 a 13  $\mu\text{m}$  de largo y 4 a 6  $\mu\text{m}$  de ancho (Crous *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2005) (Fig. 9).



**Figura 9.** *Botryosphaeria parva* (A) Cultivo puro en OA, (B y C) Conidias inmaduras de su anamorfo *Neofusicoccum parvum*.

#### 5.2.1.4 *Botryosphaeria rhodina* (Berk. & M.A. Curtis)

Se identificaron 47 aislados como *B. rhodina* en su estado anamorfo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. En APDA o agar de avena (OA) la colonia inicialmente es gris verdosa, con el tiempo se torna color negro. Produce micelio aéreo con picnidios en el medio de cultivo de 100 a 115  $\mu\text{m}$  de largo y 70 a 75  $\mu\text{m}$  de ancho. Las conidias son inicialmente hialinas, aseptadas, ovoides a elipsoides con pared engrosada. Las conidias maduras son bicelulares, de un tamaño promedio de 20 a 30  $\mu\text{m}$  de largo y 10 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho, de color marrón con numerosas estrías longitudinales (Crous *et al.*, 2004; Burgess *et al.*, 2006; Ploetz, 2003 y 2007) (Fig. 10).



**Figura 10.** *Botryosphaeria rhodina* (A) Cultivo puro en OA, (B) Picnidio y conidias y (C) Conidia inmadura hialina (a) y madura pigmentada y con estraciones (b) en su estado anamorfo, *Lasiodiplodia theobromae*.

#### 5.2.1.5 *Botryosphaeria ribis* (Grossenb. & Duggar)

Se identificó un aislado como *B. ribis* en su estado anamorfo *Neofusicoccum ribis* (Grossenb. & Duggar) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips proveniente de inflorescencias de longán. En APDA y OA la colonia fue de color negro grisáceo. Produce micelio aéreo con picnidios en el medio de cultivo de forma y tamaño irregular. Las conidias son hialinas, aseptadas, ovoides a elipsoides con un tamaño promedio de 15 a 20 µm de largo y 4 a 7 µm de ancho (Crous *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2004) (Fig. 11).



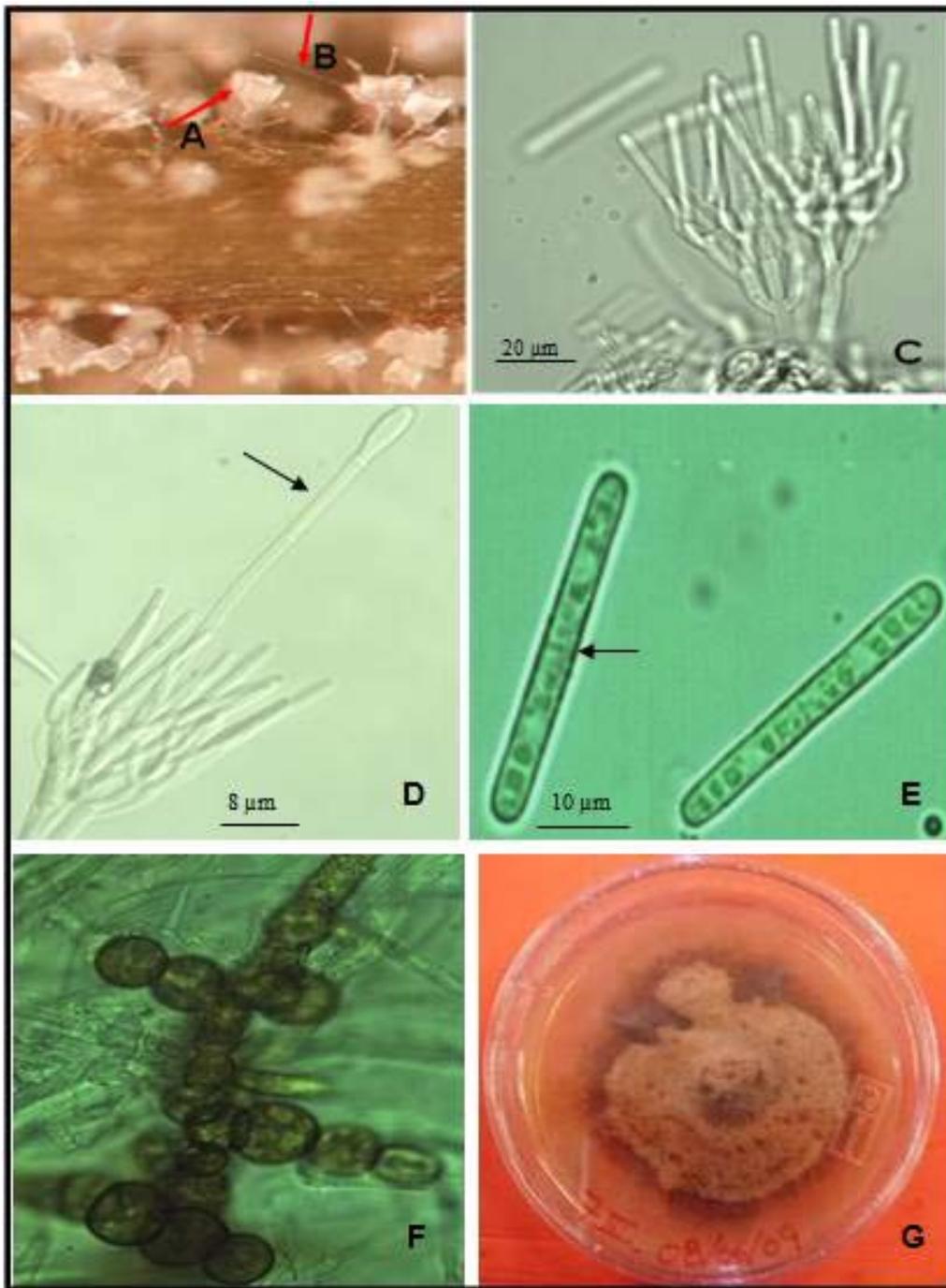
**Figura 11.** *Botryosphaeria ribis* (A) Cultivo puro en OA, (B y C) Conidias inmaduras hialinas de su anamorfo, *Neofusicoccum ribis*.

#### **5.2.1.6 *Calonectria pseudospathiphylli* J.C. Kang, Crous & C.L. Schoch**

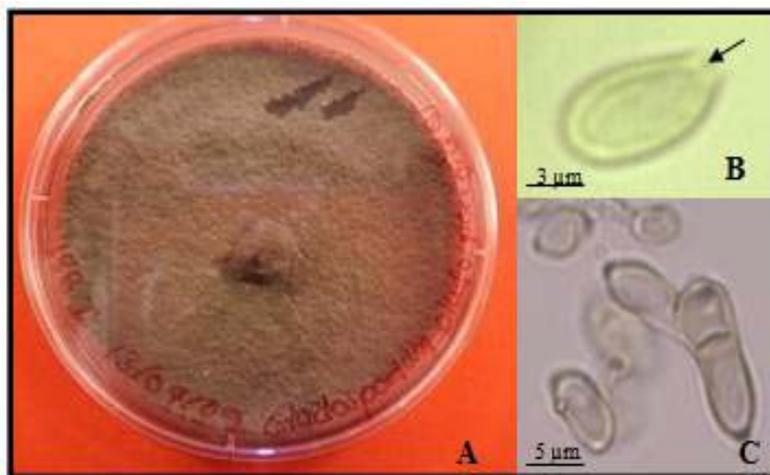
Se identificaron 2 aislados como *Calonectria pseudospathiphylli* en su estado anamorfo *Cylindrocladium pseudospathiphylli* J.C. Kang, Crous & C.L. Schoch. En medio de cultivo APDA y agar de malta (MA) la colonia produce micelio aéreo color ambar. En agar de agua con hojas de clavel (CLA) produce clamidosporas en cadena formando microsclerocios, conidióforos y estípites hialinos con una vesícula terminal de 8 a 9  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los conidióforos son ramificados de tres a cuatro ramas, la rama terminal produce 2 a 4 fiálidos hialinos aseptados donde se ubican las conidias. Las conidias son hialinas, cilíndricas, redondeadas en ambos extremos con un septo transversal y tamaño de 40 a 43  $\mu\text{m}$  de largo por 4 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho (Crous *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 2001; Crous *et al.*, 2006; Lombard *et al.*, 2009 y 2010) (Fig. 12).

#### **5.2.1.7 *Cladosporium* spp. (Fresenius) G.A. de Vries**

Se identificaron 16 aislados como *Cladosporium* spp. provenientes de frutos de rambután y longán. En medio de cultivo APDA, la colonia produce micelio aéreo de color verde oliváceo a marrón oliváceo. Los conidióforos son oscuros, alargados, agrupados o individuales, ramificados, con conidias color pardo oliváceo, unicelulares con cicatrices de color oscuro cuando se desprende del conidióforo, variables en forma y tamaño de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de largo y 2 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho, algunas ovoides, cilíndricas, limoniformes o irregulares (Crous *et al.*, 2004) (Fig. 13).



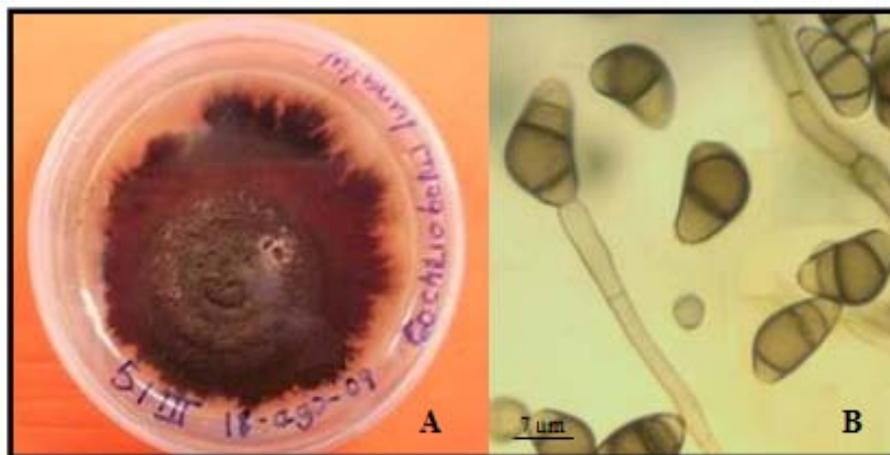
**Figura 12.** *Calonectria pseudospathiphylli* (A y B) Conidióforo y vesícula sobre hoja de clavel en CLA, (C) Conidióforo y conidias, (D) Estípite con vesícula terminal (flecha), (E) Conidias 1 septo (flecha), de su anamorfo *Cylindrocladium pseudospathiphylli* (F) Clamidosporas en cadena y (G) Cultivo puro en APDA.



**Figura 13.** *Cladosporium* spp. (A) Cultivo puro en APDA, (B) Conidia limoniforme con cicatriz (Flecha) y (C) Conidias irregulares.

#### 5.2.1.8 *Cochliobolus lunatus* R.R. Nelson & F.A. Haasis

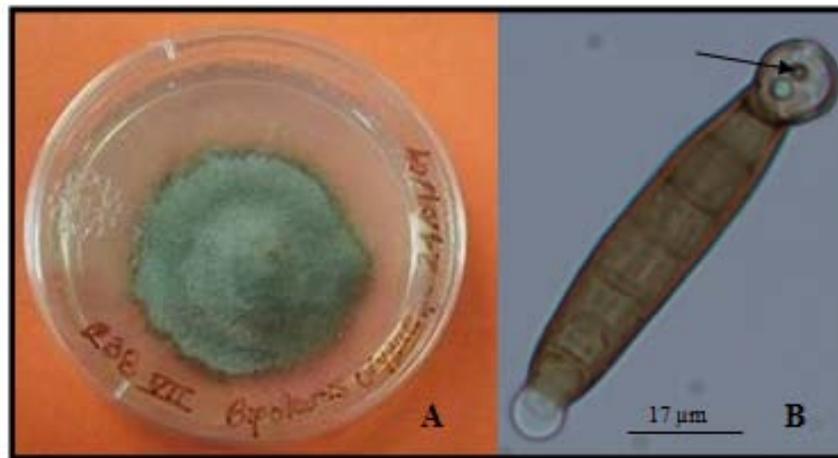
Se identificaron 8 aislados como *Cochliobolus lunatus* en su estado anamorfo *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. En medio de cultivo APDA, la colonia produce micelio inmerso de color negro. Los conidióforos son oscuros, septados, pueden ser solitarios o en grupos pequeños, simples o ramificados. Las conidias son curvas, de color marrón, con 3 septos y engrosadas en la tercera célula, con un tamaño de 15 a 18 μm de largo y 7 a 10 μm de ancho (Crous *et al.*, 2004) (Fig. 14).



**Figura 14.** *Cochliobolus lunatus* (A) Cultivo puro en APDA, (B) Conidióforo y conidias de su anamorfo *Curvularia lunata*.

### 5.2.1.9 *Cochliobolus miyabeanus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur

Se identificaron 2 aislados como *Cochliobolus miyabeanus* en su estado anamorfo, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan). En medio de cultivo APDA, la colonia produce micelio aéreo de color gris verdoso, las conidias son color pardo, curvas, fusiformes, obclavadas o cilíndricas con 6 a 10 septos transversales y un tamaño de 70 a 75  $\mu\text{m}$  de largo y 14 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho. La germinación de la conidia ocurre por los polos a través de una vesícula globosa (Crous *et al.*, 2004) (Fig. 15).

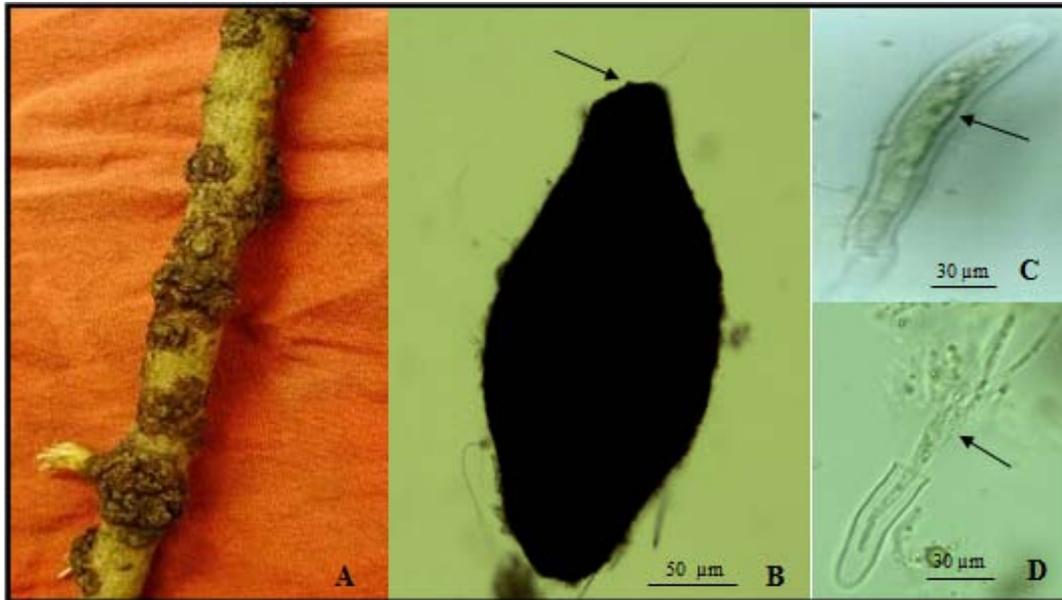


**Figura 15.** *Cochliobolus miyabeanus* (A) Cultivo puro en APDA y (B) Conidia de su anamorfo *Bipolaris oryzae* con vesículas globosas en el punto de germinación (flecha).

### 5.2.1.10 *Dolabra nepheliae* C. Booth & W.P. Ting

Se observó a *Dolabra nepheliae* en tallos de rambután. En el tejido vegetal produce pseudotecios piriformes con un tamaño de 200 a 210  $\mu\text{m}$  de largo y 120 a 140  $\mu\text{m}$  de ancho. En APDA el micelio es de color gris a blanco verdoso. Las ascas son bitunicadas de 130 a 135  $\mu\text{m}$  de largo y 8 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho, contiene 8 ascosporas filiformes orientadas paralelamente, hialinas, con 4 septos transversales, con una longitud de 85 a 90  $\mu\text{m}$  de largo y 2 a 2.5  $\mu\text{m}$  de ancho. El ostiolo es de forma cilíndrica con un

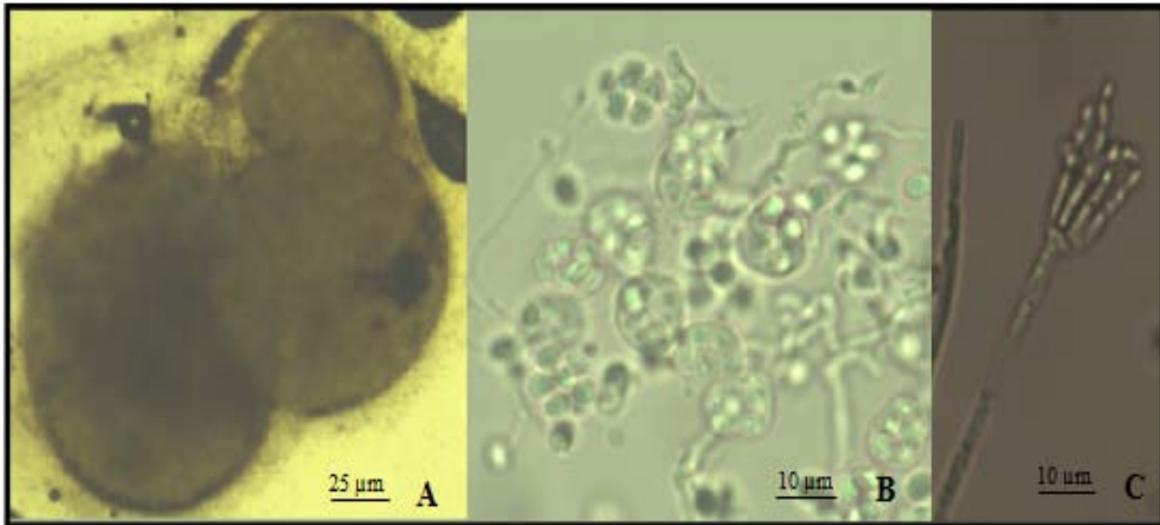
tamaño de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Booth y Ting, 1964; Zalasky *et al.*, 1971; Rossman *et al.*, 2007) (Fig. 16).



**Figura 16.** *Dolabra nepheliae* (A) Sintomatología observada sobre corteza de rambután (B) Pseudotecio con ostiolo (flecha), (C) Ascas bitunicadas (flecha), (D) Ascosporas filiformes.

#### 5.2.1.11 *Eurotium* sp. Link

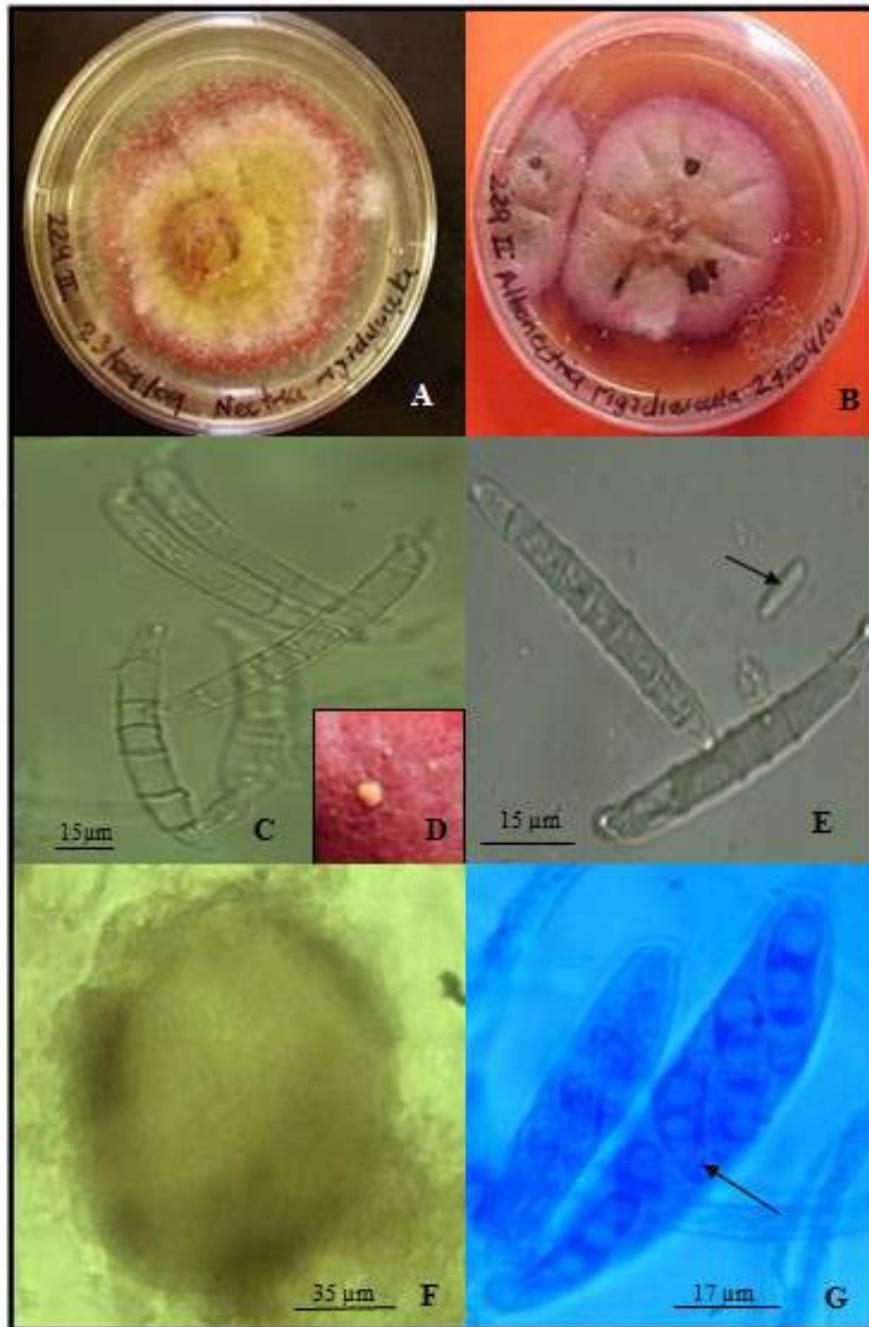
Se identificaron 4 aislados como *Eurotium* spp. provenientes frutos de rambután. En APDA produce micelio flocoso color verde con márgenes rojizas. Los cleistotecios son de color amarillo a naranja globosos de 100 a 120  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las ascas son redondeadas de 9.5 a 10.5  $\mu\text{m}$  de diámetro con 6 ascosporas lenticulares. En su estado anamorfo *Penicillium* spp. Link, produce conidióforos simples o ramificados que terminan en un grupo de fialidos. Las conidias son en cadena, hialinas o verde brillante, unicelulares y globosas con un tamaño de 2 a 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Alexopoulos *et al.*, 1996; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 17).



**Figura 17.** *Eurotium* spp. (A) Cleistotecio (B) Ascas con ascosporas (C) Conidióforo de su anamorfo *Penicillium* spp.

#### 5.2.1.12 *Albonectria rigidiuscula* (Berk. & Broome) Rossman & Samuels

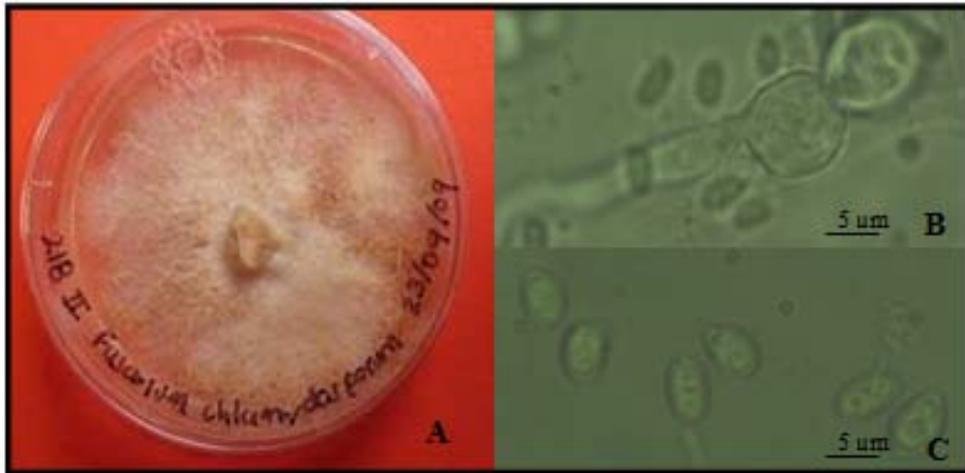
Se identificaron 20 aislados como *Albonectria rigidiuscula*. En medio de cultivo APDA la colonia produce inicialmente micelio aéreo color rosado en los bordes y en el centro una coloración amarilla, a los 8 días se torna de color rosado a rojo. Los peritecios son globosos de color amarillo con un tamaño de 120 a 200 µm de diámetro. Las ascas son clavadas, unitunicadas de 60 a 70 µm de largo y 11 a 12 µm de ancho con 4 a 6 ascosporas de 15 a 20 µm de largo y 5 a 7 µm de ancho, hialinas, reniformes y tres tabiques transversales. En su estado anamorfo, *Fusarium decemcellulare* Brick las macroconidias son hialinas, fusiformes, curvadas con 5 a 7 septos transversales de 60 a 65 µm de largo X 5 a 7 µm de ancho y se agrupan en esporodoquios color amarillo. Las microconidias son abundantes, aseptadas, elipsoides con un tamaño de 10 a 10.5 µm de largo y 3 a 4 µm de ancho (Rossman *et al.*, 1999; Crous *et al.*, 2004; Leslie y Summerell, 2006) (Fig. 18).



**Figura 18.** *Albonectria rigidiuscula* (A) Crecimiento inicial de cultivo puro en APDA (B) Crecimiento en cultivo puro a los 8 días en APDA, (C) Macroconidias de su anamorfo, *Fusarium decemcellulare* (D) Esporodocio de su anamorfo sobre micelio en APDA, (E) Macroconidias y microconidias (flecha) de su anamorfo, (F) Peritecio y (G) Ascas con ascosporas (flecha).

#### 5.2.1.13 *Fusarium chlamydosporum* Wollenw. & Reinking

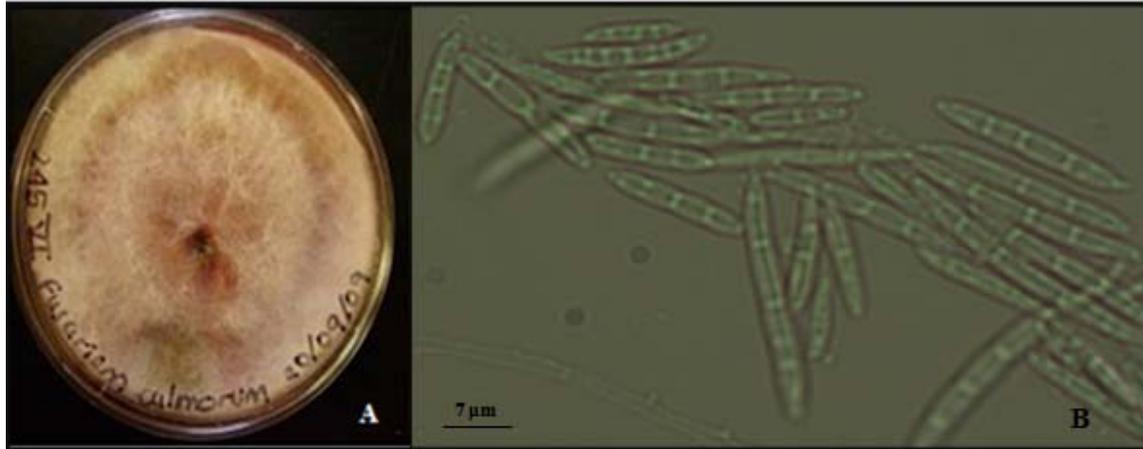
Se identificaron 20 aislados como *Fusarium chlamydosporum*. En medio de cultivo APDA presenta clamidosporas abundantes en cadena de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro. La colonia produce micelio aéreo color blanco y en el centro una coloración amarilla. No produce macroconidias, las microconidias son hialinas, cilíndricas, aseptadas de 5 a 6  $\mu\text{m}$  de largo y 3.5 a 4.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Crous *et al.*, 2004; Leslie y Summerell, 2006) (Fig. 19).



**Figura 19.** *Fusarium chlamydosporum* (A) Cultivo puro en APDA (B) Clamidosporas y (C) Microconidias.

#### 5.2.1.14 *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc.

Se identificaron 10 aislados como *Fusarium culmorum* provenientes de inflorescencias de longán. En medio de cultivo APDA la colonia produce micelio aéreo inicialmente color blanco a los 8 días se torna rojizo. Las macroconidias son hialinas, fusiformes, ligeramente curvadas, con 3 a 4 septos transversales, de 15 a 35  $\mu\text{m}$  de largo y 2.5 a 3.5  $\mu\text{m}$  de ancho. No produce microconidias (Crous *et al.*, 2004; Leslie y Summerell, 2006) (Fig. 20).



**Figura 20.** *Fusarium culmorum* (A) Cultivo puro en APDA (B) Macroconidias.

#### 5.2.1.15 *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk

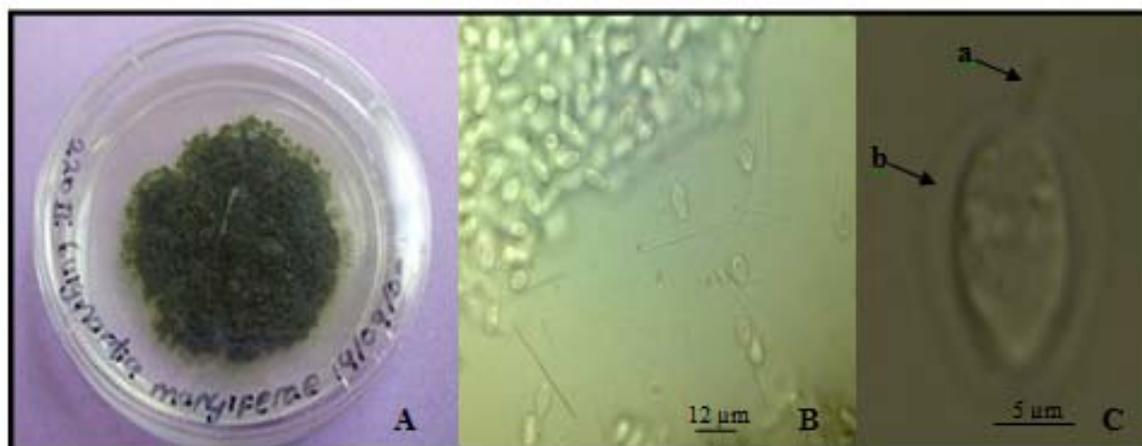
Se identificaron 43 aislados como *Glomerella cingulata* provenientes de hojas, inflorescencias y frutos de rambután y longán. En medio de cultivo APDA produce sus dos fases, teleomorfa *G. cingulata* y anamorfo, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. con micelio aéreo color blanco grisáceo. En su fase teleomorfa, los peritecios son globosos, inmersos en el medio de cultivo, con un tamaño de 70 a 150 µm de largo y 70 a 100 µm de ancho. Las ascas son unitunicadas, con paredes delgadas y 6 a 8 ascosporas unicelulares, hialinas, cilíndricas de 15 a 18 µm de largo y 6 a 7 µm de ancho. En su estado anamorfo, produce acérvulos con setas variables en longitud con un rango de 100 a 150 µm de largo, las conidias son hialinas, cilíndricas con terminales obtusos con un tamaño de 12 a 14 µm de largo y 4.5 a 5.5 µm de ancho (Hanlin, 1997, Crous *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2005) (Fig. 21).



**Figura 21.** *Glomerella cingulata* (A) Cultivo puro en APDA (B) Peritecio con ascosporas (C) Setas y arcérvulos y (D) Conidias de su anamorfo, *Colletotrichum gloeosporioides*.

#### 5.2.1.16 *Guignardia mangiferae* A.J. Roy

Se identificó un aislado como *G. mangiferae* en su estado anamorfo *Phyllosticta capitalensis* Henn. proveniente de frutos rambután. En medio de cultivo APDA la colonia produce micelio inmerso gris oliváceo a negro. Los picnidios son globosos a piriformes con un tamaño de 150 a 200  $\mu\text{m}$  de largo y 100 a 120  $\mu\text{m}$  de ancho. Las conidias son ovoides, truncadas en la base y redondeadas en el ápice de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de largo y 6 a 6.5  $\mu\text{m}$  de ancho, presentan una envoltura mucoide de un tamaño de 1.5 a 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y un apéndice apical de 3.5 a 4  $\mu\text{m}$  de largo (Baayen *et al.*, 2002; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 22).



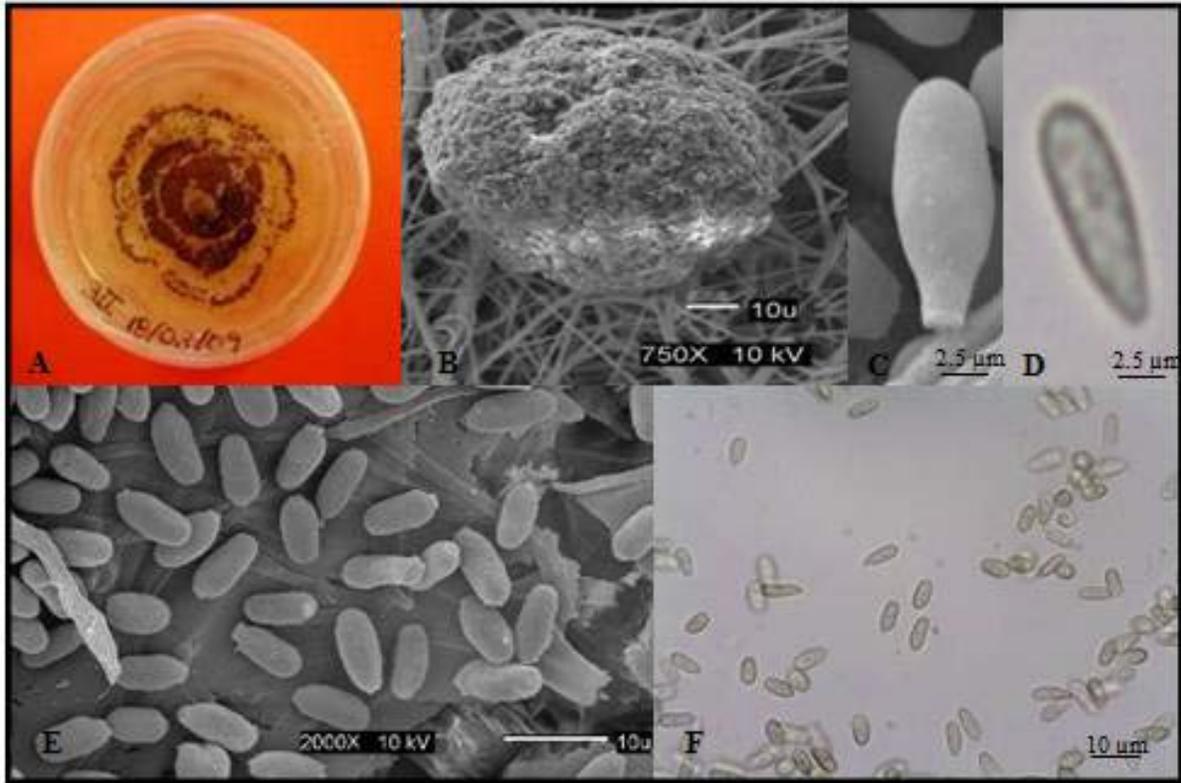
**Figura 22.** *Guignardia mangiferae* (A) Cultivo puro en APDA (B) Conidias y (C) Detalle de la conidia de su anamorfo *Phyllosticta capitalensis* con apéndice (a) y envoltura mucoide (b).

#### 5.2.1.17 *Lasmenia* spp. Speg.

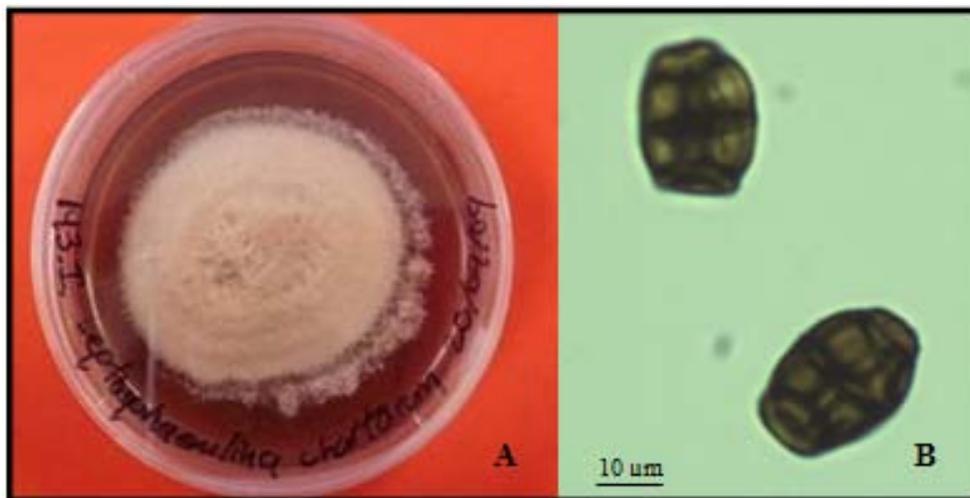
Se identificaron 112 aislados como *Lasmenia* spp. provenientes de hojas, inflorescencias y frutos de rambután (Verkley, Centro de Biodiversidad de Hongos, Utrecht, Holanda, com. pers. 2010). En medio de cultivo APDA produce micelio inmerso color crema con anillos concéntricos color marrón. Produce acérvulos, las conidias son obclavadas, aseptadas, con paredes engrosadas, marrón claro de 10 a 12 µm de largo y 4.0 a 5.0 µm de ancho (Nishijima *et al.*, 2001; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 23).

#### 5.2.1.18 *Leptosphaerulina chartarum* Cec. Roux

Se identificaron 2 aislados como *L. chartarum* en su estado anamorfo de *Pithomyces chartarum* (Berk. & M.A. Curtis) M.B. Ellis, provenientes de inflorescencias y frutos de rambután y longán. En medio de cultivo APDA produce micelio aéreo color crema. Los conidióforos son cortos y simples, las conidias son oblongas a piriformes o irregulares de color marrón oscuro con septos longitudinales y transversales de 20 a 22 µm de largo y 14.5 a 15.5 µm de ancho (Hanlin, 1997; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 24).



**Figura 23.** *Lasmenia* spp. (A) Cultivo puro del aislado 3II en APDA (B) Acérvulo observado con microscopía electrónica de rastreo (SEM), Detalle de conidias obclavadas en SEM (C) y microscopía de luz (D), (E) Conidias en (SEM) y (F) Conidias en microscopio de luz.



**Figura 24.** *Leptosphaerulina chartarum* (A) Cultivo puro en APDA (B) Conidias de su estado anamorfo, *Pithomyces chartarum*.

### 5.2.1.19 *Leuconectria clusiae* Rossman, Samuels & Lowen

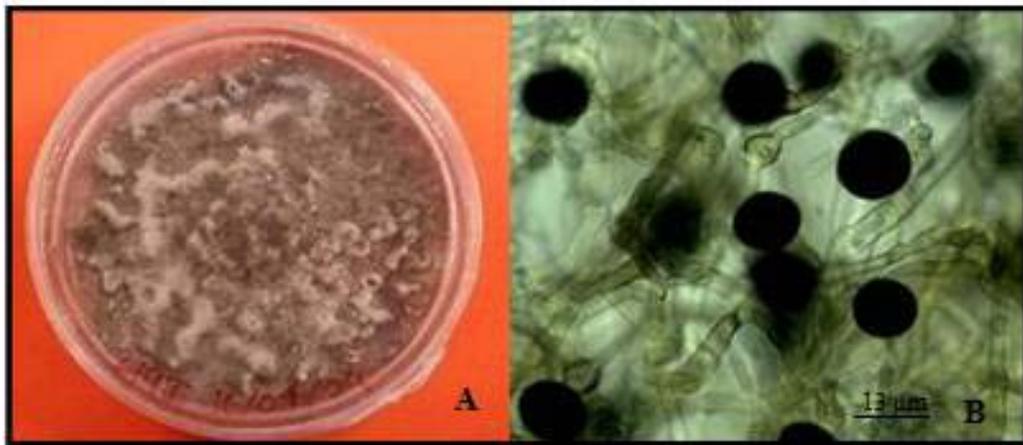
Se identificó un aislado como *Leuconectria clusiae* en su estado anamorfo de *Gliocephalotrichum bulbilium* J.J. Ellis & Hesselt., provenientes de frutos de rambután. En APDA y CMA produce micelio inmerso con agregados bulbiloides, inicialmente la colonia es color amarillo y se torna marrón claro con el tiempo. Los conidióforos son abundantes y se desarrollan rápidamente en el medio de cultivo, tienen un tamaño de 120 a 200  $\mu\text{m}$  de largo y 10 a 12  $\mu\text{m}$  de ancho. El penicilio es ramificado con tres ramas y un tamaño de 72 a 74  $\mu\text{m}$  de largo y 20 a 30  $\mu\text{m}$  de ancho. Presenta estípites estériles que se encuentran ubicadas por debajo del penicilio de 120 a 150  $\mu\text{m}$  de largo. Las fiálides son cilíndricas y las conidias son elipsoides con un tamaño de 5.5 a 7.5  $\mu\text{m}$  de largo y 2 a 2.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Wiley y Simmons, 1971; Rossman *et al.*, 1993; Decock *et al.*, 2006) (Fig. 25).



**Figura 25.** *Leuconectria clusiae* (A) Cultivo puro en APDA (B) Agregados bulbiloides y (C) Conidióforo de su estado anamorfo *Gliocephalotrichum bulbilium* con estípites estériles (flecha).

#### 5.2.1.20 *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome)

Se identificaron 162 aislados como *N. oryzae* provenientes de hojas, inflorescencias y frutos de rambután y longán. En medio de cultivo APDA la colonia produce micelio aéreo color gris. Los conidióforos son cortos y simples, las conidias son negras, brillantes, unicelulares, globosas, aplanadas y presentan una vesícula hialina donde termina el conidióforo, de 13 a 15 de largo y 12 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho (Barnett y Hunter, 1998; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 26).

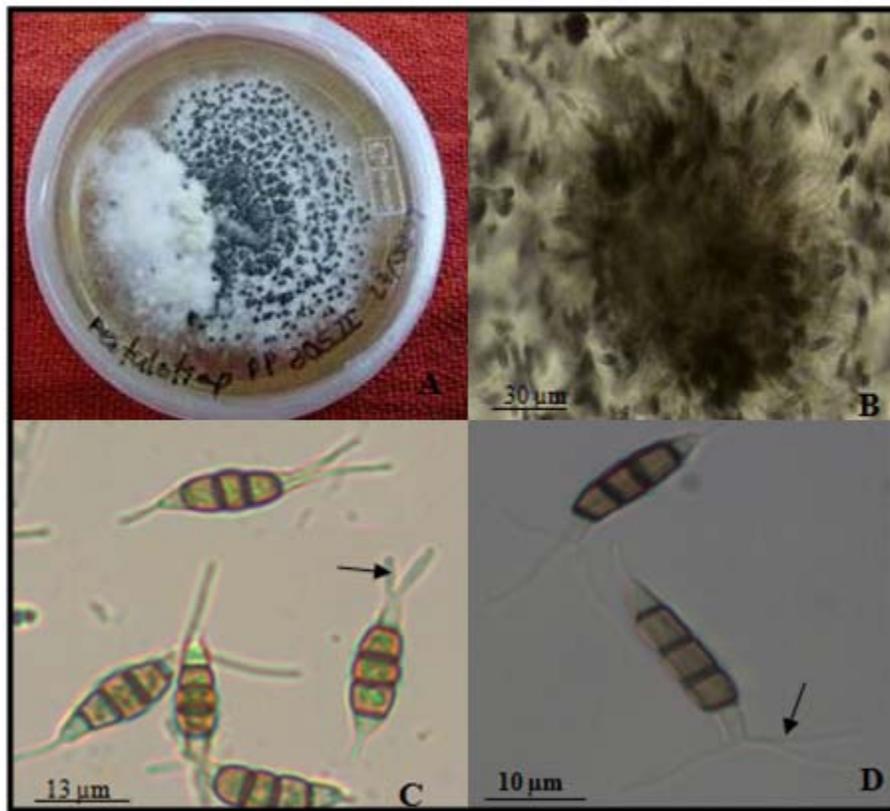


**Figura 26.** *Nigrospora oryzae* (A) Cultivo puro en APDA (B) Conidia.

#### 5.2.1.21 *Pestalotiopsis* spp. Steyaert

Se identificaron 91 aislados como *P. virgatula* (Kleb) Steyaert y 26 aislados de *P. clavispota* (G.F. Atk.) Steyaert provenientes de hojas, corteza, inflorescencias y frutos de rambután y longán. En medio de cultivo APDA la colonia para las dos especies produce micelio color blanco con acérvulos oscuros, inmersos o errumpentes en el medio de cultivo. Para *P. clavispota* los conidióforos son cortos y simples, las conidias son fusiformes ligeramente curvadas con cinco células, tres células pigmentadas en el centro y dos hialinas en los extremos de 23 a 25  $\mu\text{m}$  de largo y 8 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho. Presenta

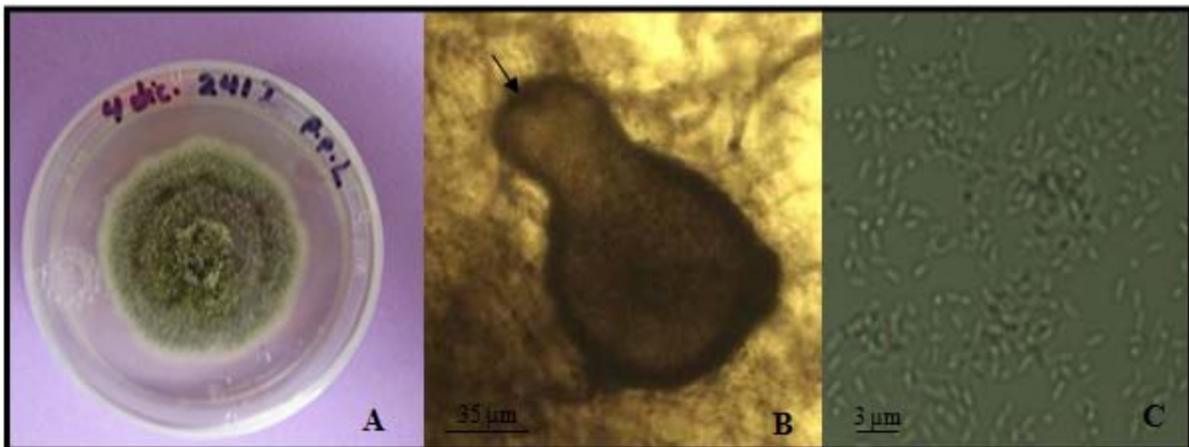
dos apéndices en la parte terminal de la conidia de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y un apéndice basal de 3.5 a 4  $\mu\text{m}$  de largo. Para *P. virgatula* los conidióforos son cortos y simples, las conidias son fusiformes ligeramente curvadas con cinco células, tres células pigmentadas en el centro y dos hialinas en los extremos de 20 a 25  $\mu\text{m}$  de largo y 5 a 5.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Presenta 3 apéndices en la parte terminal de la conidia de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y un apéndice basal de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de largo (Barnett y Hunter, 1998; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 27).



**Figura 27.** *Pestalotiopsis* spp. (A) Cultivo puro en APDA (B) Acérvulo, (C) Conidias con apéndices de *Pestalotiopsis clavispora* (flecha) y (D) Conidias con apéndices (flecha) de *Pestalotiopsis virgatula*.

#### 5.2.1.22 *Phoma* spp. Sacc.

Se identificaron 23 aislados como *Phoma* spp. provenientes de hojas, inflorescencias y corteza de rambután y longán. En medio de cultivo APDA la colonia produce micelio aéreo de diferentes colores que van desde grisáceos, verde oliváceo y marrón claro con centro blanco. Los picnidios son globosos a obpiriformes con un ostiolo central de color marrón claro en el centro y marrón oscuro en las paredes de 100 a 120  $\mu\text{m}$  de largo y 60 a 70  $\mu\text{m}$  de ancho. Las conidias son hialinas, pequeñas, unicelulares, ocasionalmente con un solo septo, oblongas a elipsoidales de tamaño 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo y 1 a 2  $\mu\text{m}$  de ancho (Barnett y Hunter, 1998; Crous *et al*, 2004) (Fig. 28).

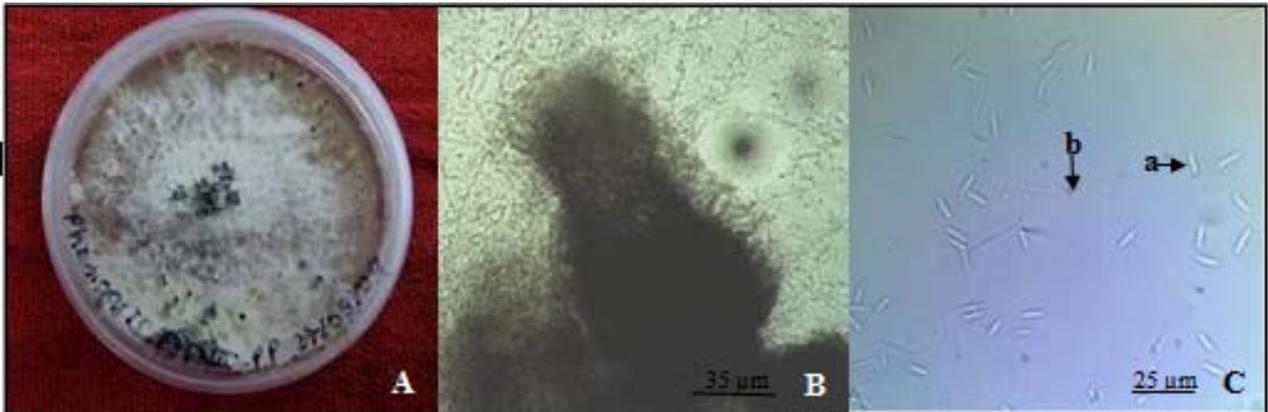


**Figura 28.** *Phoma* spp. (A) Cultivo puro en APDA (B) Picnidio obpiriforme con ostiolo (flecha) y (C) Conidias.

#### 5.2.1.23 *Phomopsis* spp. Sacc. & Roum.

Se identificaron 162 aislados como *Phomopsis* spp., provenientes de hojas, inflorescencias y frutos de rambután y longán. En medio de cultivo APDA la colonia produce micelio inmerso color blanco con picnidios oscuros errumpentes. Los picnidios ampuliformes, oscuros, ostiolados con paredes gruesas de tamaño 120 a 200  $\mu\text{m}$  de largo y 70 a 80  $\mu\text{m}$  de ancho. Presenta dos tipos de conidias hialinas (alfa y beta). Las alfa

conidia son ovoides, aseptadas y unicelulares de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de largo y 3 a 3.5  $\mu\text{m}$  de ancho, las beta conidias son filiformes y curvadas de 24 a 26  $\mu\text{m}$  de largo y 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Barnett y Hunter, 1998; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 29).



**Figura 29.** *Phomopsis* spp. (A) Cultivo puro en APDA (B) Picnidio y (C) Conidias alfa (a) y beta (b).

#### 5.2.1.24 *Sordaria fimicola* (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.

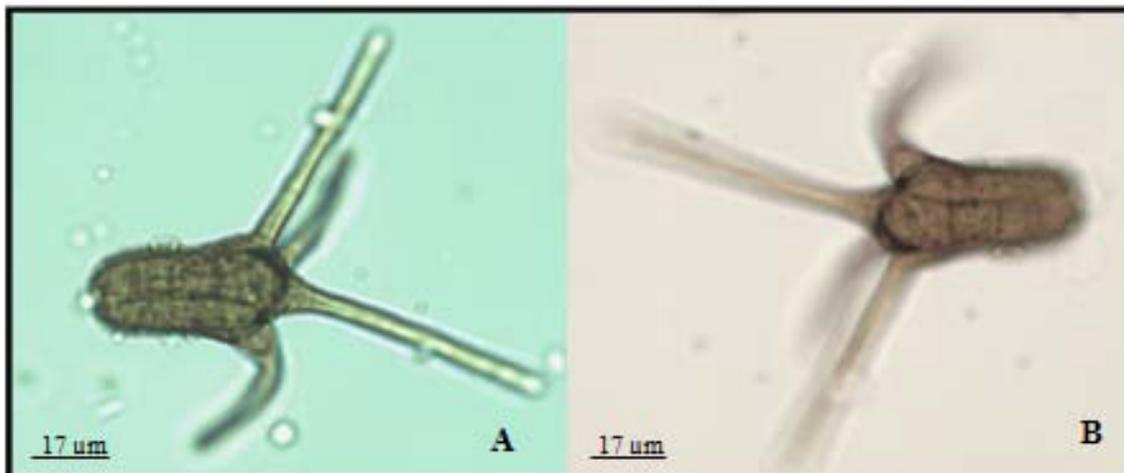
Se identificaron dos aislados como *S. fimicola* provenientes de hojas de longán. En medio de cultivo APDA la colonia produce micelio inmerso color blanco con peritecios oscuros errumpentes. Los peritecios son obpiriformes, marrón oscuro de 250 a 350  $\mu\text{m}$  de largo y 250 a 260  $\mu\text{m}$  de ancho. Las ascas son octosporadas, unitunicadas, cilíndricas, el ápice es truncado con dos anillos de 105 a 110  $\mu\text{m}$  de largo y 14 a 15  $\mu\text{m}$  de ancho. Las ascosporas son unicelulares, subglobosas, marrón claro cuando son inmaduras y marrón oscuro una vez maduras con tamaño de 14 a 17  $\mu\text{m}$  de largo y 10 a 11  $\mu\text{m}$  de ancho (Hanlin, 1997; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 30).



**Figura 30.** *Sordaria fimicola* (A) Cultivo puro en APDA, (B) Peritecio y ascas (C) Ascas unitunicadas con ascosporas y anillos apicales (flecha).

#### 5.2.1.25 *Tetraploa aristata* Berk. & Broome

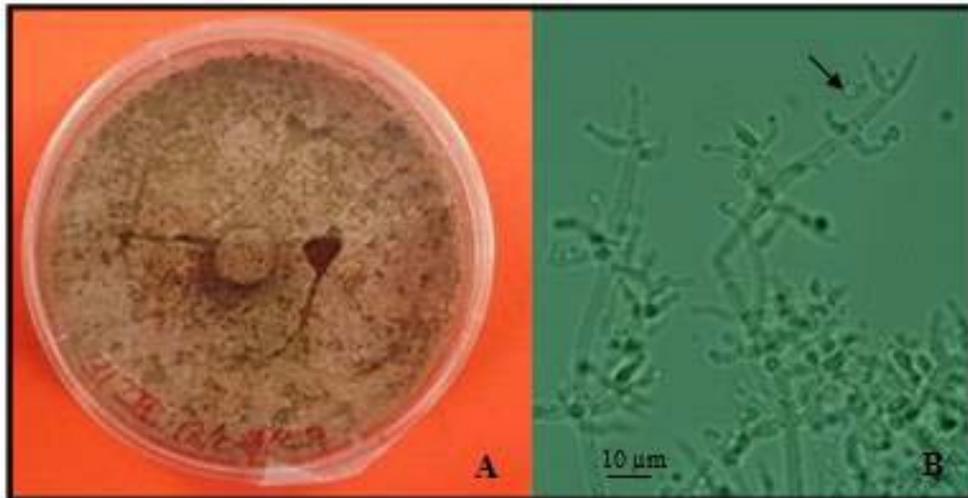
Se identificó un aislado como *T. aristata* provenientes de frutos de longán. Las conidias son solitarias, sésiles, verruculosas, de color marrón oscuro, con superficie áspera, compuestas de 4 celdas paralelas de 35 a 40 µm de largo y 15 a 16 µm de ancho, con surcos poco profundos sobre cada celda que termina en un apéndice. Los apéndices son setiformes y septados de 40 a 50 µm de largo y 3 a 4 µm de ancho (Santos – Flores y Betancourt – López, 1987) (Fig. 31).



**Figura 31.** Conidias de *Tetraploa aristata* (A y B).

#### 5.2.1.26 *Trichoderma* spp. Pers.

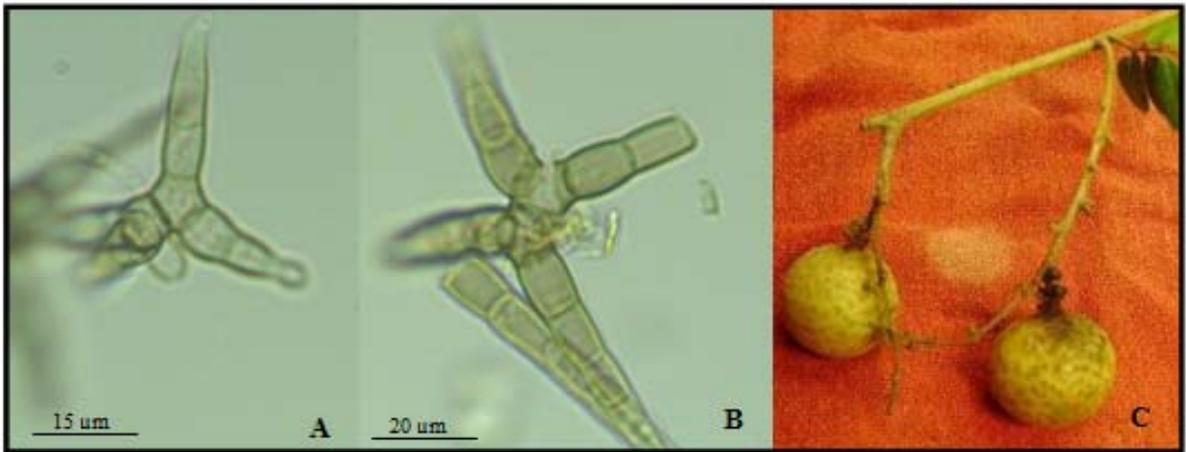
Se identificaron 11 aislados como *Trichoderma* spp. provenientes de hojas y corteza de rambután y longán. En medio de cultivo APDA la colonia produce micelio aéreo inicialmente blanco color y a medida que esporula se torna color verde. Los conidióforos son ramificados ampuliformes en forma piramidal con ángulos rectos, con fiálidos en verticilios de 10 a 13  $\mu\text{m}$  de largo. Las conidias son esféricas, de paredes lisas, hialinas a verde pálido de 3 a 3.5  $\mu\text{m}$  de largo y 2.5 a 3  $\mu\text{m}$  de ancho (Banertt y Hunter, 1998, Crous *et al.*, 2004) (Fig. 32).



**Figura 32.** *Trichoderma* spp. (A) Cultivo puro en APDA y (B) Conidióforo y conidias (flecha).

#### 5.2.1.27 *Tripospermum porosporiferum* Matsush.

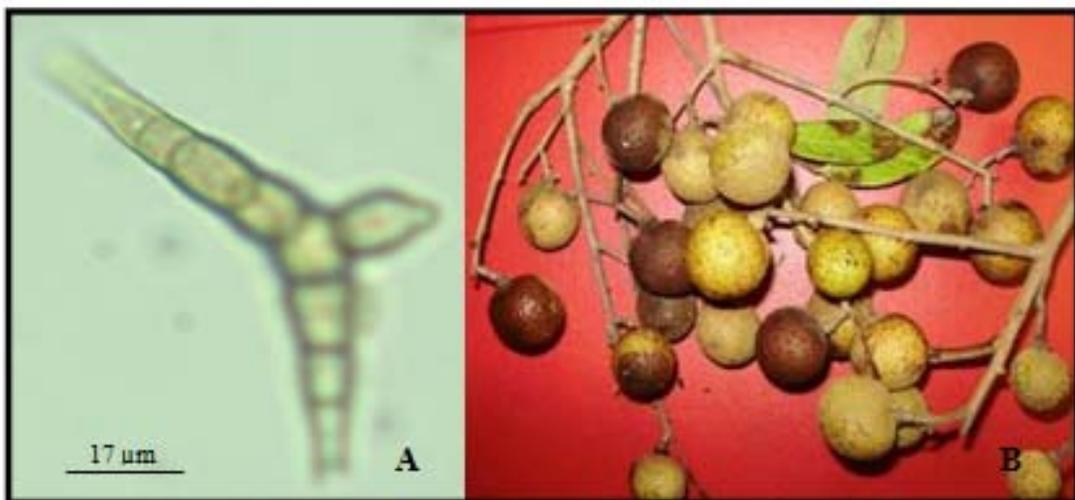
Se identificó un aislado como *T. porosporiferum* proveniente de frutos de longán. Las conidias son tetra-radiadas a penta-radiadas, marrón claro de 40 a 50  $\mu\text{m}$  de largo y 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho con un eje central de donde salen 4 a 5 apéndices septados y dos células basales de 16  $\mu\text{m}$  de longitud (Santos-Flores y Betancourt-López, 1987) (Fig. 33).



**Figura 33.** *Tripospermum porosporiferum* (A y B) Conidias, (C) Fumagina ocasionada por el hongo.

#### 5.2.1.28 *Tripospermum variable* Matsush.

Se identificó un aislado como *T. variable* proveniente de frutos de longán. Las conidias son tri-radiadas, en forma de Y, marrón claro de 34 -36 µm de largo X 6 - 7 µm de ancho con un eje central de donde salen 3 apéndices septados y 1 célula basal de 6.5 µm de longitud (Santos–Flores y Betancourt–López, 1987) (Fig. 34).



**Figura 34.** *Tripospermum variable* (A) Conidia y (B) Fumagina ocasionada por el hongo en frutos de longán.

### 5.2.1.29 *Xylaria* spp. Hill ex Schrank

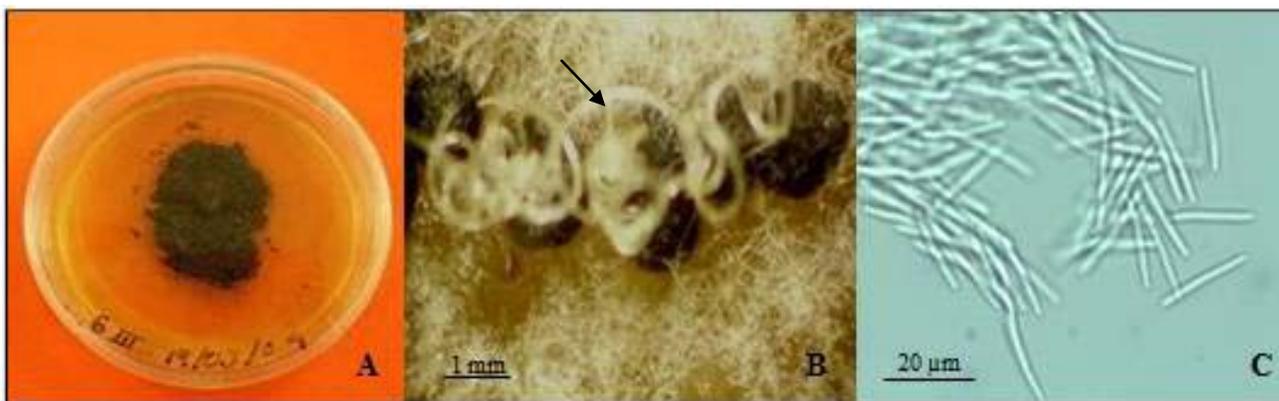
Se identificaron 15 aislados como *Xylaria* spp. En APDA la colonia es algodonosa, blanca durante las primeras semanas, luego comienzan la formación de cuerpos fructíferos (estromas) color marrón. La clasificación de las especies se hizo en base a la amplificación del ANDr de la región ITS1 e ITS2 pues el hongo no produjo peritecios en el estroma (Hanlin, 1997; Crous *et al.*, 2004) (Fig. 35).



**Figura 35.** *Xylaria* spp (A y B) Cultivo puro en APDA, (C y D) Estromas

### 5.2.1.30 Morfotipo 1

Se obtuvo 1 aislado proveniente de frutas de rambután. En medio de cultivo APDA produce micelio inmerso color naranja con picnidios errumpentes en el medio de cultivo. Los picnidios son globosos, ostiolados y las conidias son descargadas formando cirros. Las conidias son hialinas, uniseptadas, filiformes de 18 a 21  $\mu\text{m}$  de largo y 2 a 3  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 36).

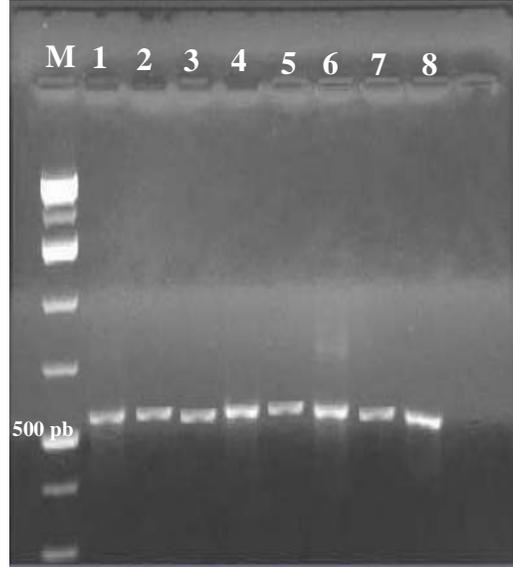


**Figura 36.** Morfotipo 1 (A) Cultivo puro en APDA, (B) Picnidios con cirros (flecha) y (C) Conidias.

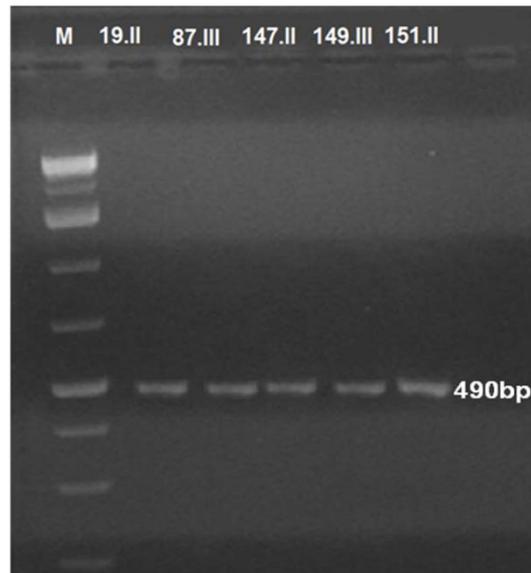
### 5.2.2 Caracterización molecular

Se amplificó y secuenció la región ITS del ADNr de 81 aislados de hongos asociados al rambután y longán (Cuadro 2). El 20% de estos fueron identificados previamente utilizando criterios morfológicos y confirmados mediante análisis de la región ITS del rDNA. Por ejemplo, los productos de PCR de los aislados 221.IV, 71, 231.I, 46.II, 61.I 60.I, 132.V y 251.I de *Botryosphaeria* spp. amplificados con los “primers” ITS1 e ITS4 tuvieron de tamaños entre 550 a 600 pb (Fig. 37). Las especies de *Phoma*, *Phomopsis* y *Xylaria* sólo fueron identificados mediante caracterización molecular.

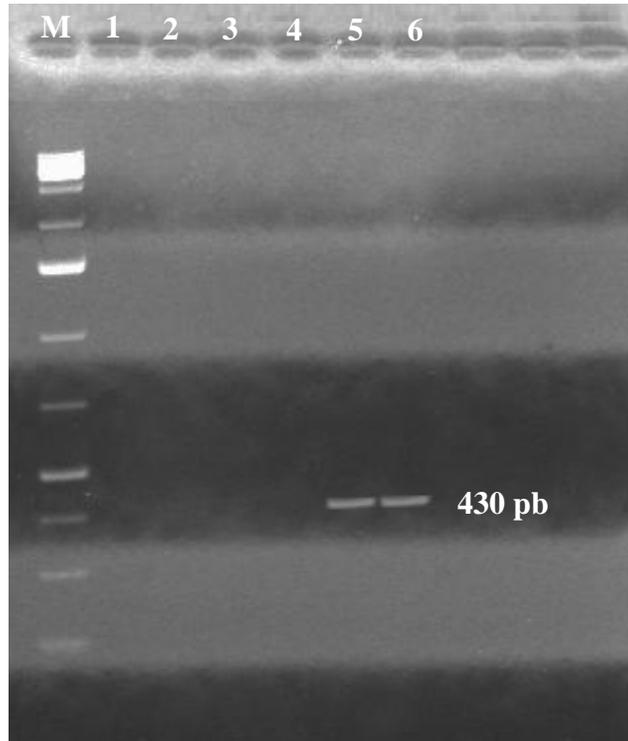
Se utilizaron “primers” específicos para la caracterización molecular de los aislados de *Colletotrichum* spp. y *Guignardia* spp. Los productos de PCR de los aislados 19.II, 87.III, 147.II y 151.II de *Colletotrichum* spp. amplificados con el primer CgInt tuvieron un tamaño de 490 pb, confirmando la especie de *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Fig. 38). El producto de PCR del aislado 220.II de *Guignardia mangiferae* amplificado utilizando el primer CAMEL2 fue de un tamaño de 430 pb confirmando la caracterización morfológica inicial de la especie (Fig. 39).



**Figura 37.** Gel de electroforesis del producto de PCR de la región ITS del ADN<sub>r</sub> utilizando los primers ITS1/ ITS4 para *Botryosphaeria* spp. Primera fosa, marcador molecular de 1 kb; segunda fosa aislado 221.IV de *B. parva*; tercera fosa aislado 71 de *B. rhodina*; cuarta fosa aislado 231.I de *B. parva*; cuarta fosa aislado 46.II de *B. rhodina*; quinta fosa aislado 61.I de *B. rhodina*; sexta fosa aislado 60.I de *B. rhodina*; séptima fosa aislado 132.V de *B. parva*; octava fosa aislado 251.I de *B. ribis*.



**Figura 38.** Gel de electroforesis del producto de PCR utilizando los primers CgInt/ ITS4 específicos para diferentes aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*.



**Figura 39.** Gel de electroforesis del producto de PCR de los aislados 147.II y 220.II utilizando los primers CITRIC1/ITS4 y CAMEL2/ITS4. Primera fosa, marcador molecular de 1 kb; Segunda y tercera fosa, controles negativos con aislado 147.II de *C. gloeosporioides*; cuarta y quinta fosa, aislado 220.II *G. mangiferae* con los primers CITRIC1/ ITS4 y quinta y sexta fosa, aislado 220.II con los primers CAMEL2 / ITS4.

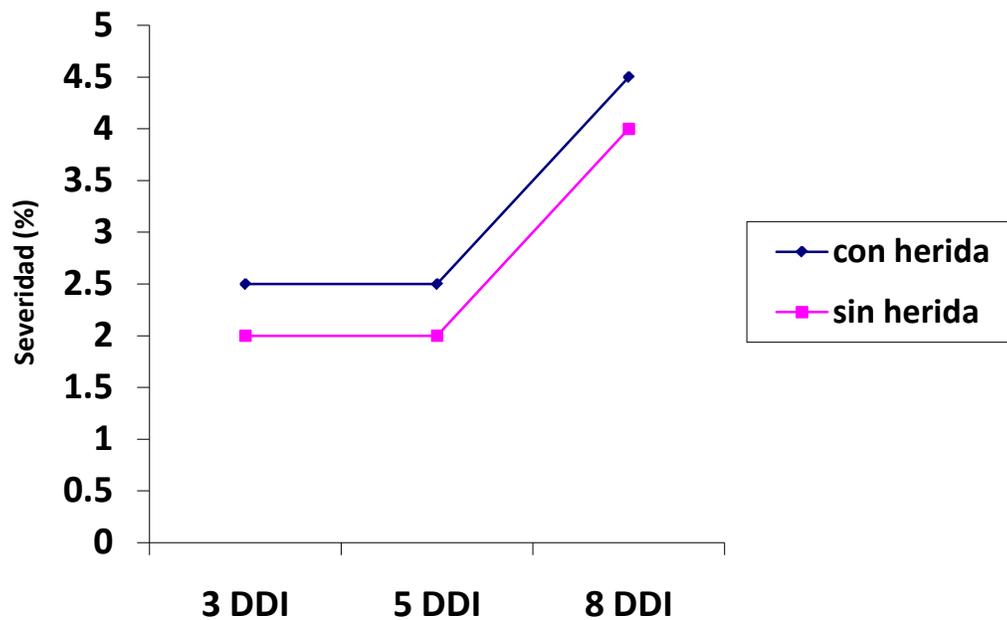
### 5.2.3 Caracterización patogénica

#### 5.2.3.1 Pruebas de patogenicidad en rambután

##### 5.2.3.1.1 Hojas

De los 19 aislados solo siete aislados fueron virulentos a las hojas de rambután, siendo patogénicas las especies *B. rhodina*, *P. virgatula* y *Lasmenia* sp. (Cuadro 7). Las especies *C. gloeosporioides*, *Phoma* spp., *A. alternata*, *P. longicolla* y *G. mangiferae* no fueron patogénicas.

*B. rhodina* (46.II) presentó el mayor porcentaje de severidad a los ocho DDI en comparación a *P. virgatula* y *Lasmenia* sp (Cuadro 7). Se observó mayor severidad de *B. rhodina* en los tratamientos con herida con un promedio de 4.5% (Fig. 40).



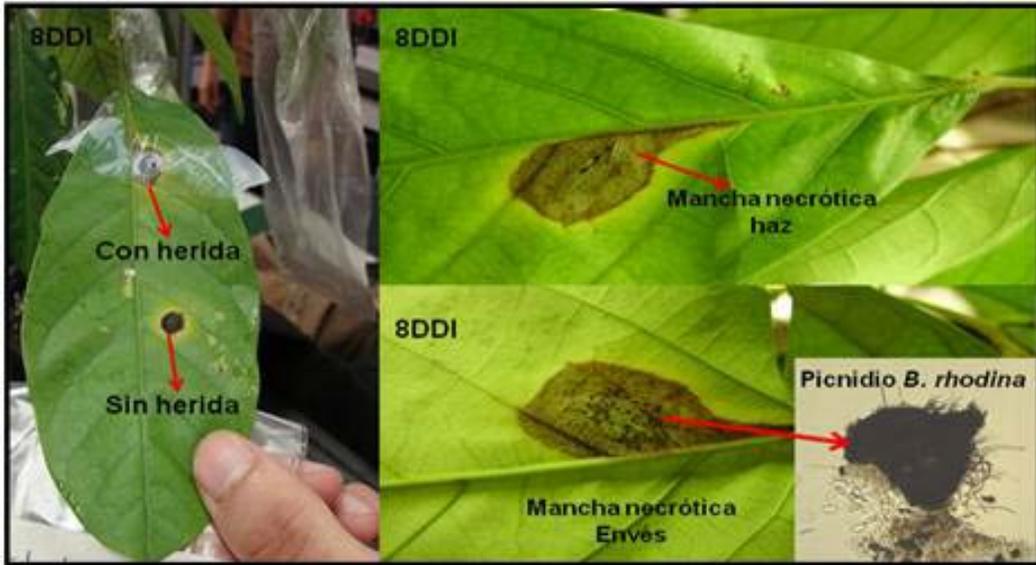
**Figura 40.** Promedio del porcentaje de severidad causada por *Botryosphaeria rhodina* (46.II) en tratamientos con y sin herida.

**Cuadro 7.** Severidad (%) de la enfermedad en hojas de rambután, *N. lappaceum* inoculadas con diferentes especies de hongos. Datos tomados a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

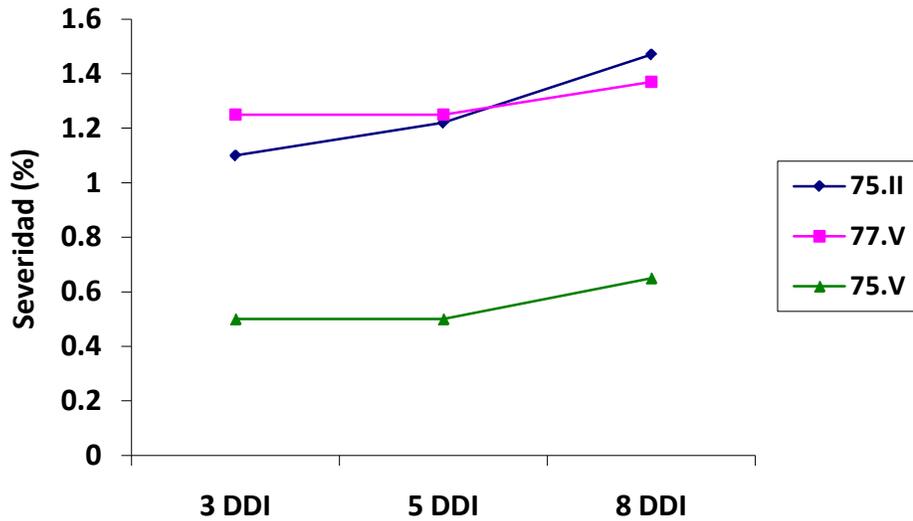
PATOGENO <sup>1</sup>	AISLADO	SEVERIDAD (%)					
		3 DDI <sup>2</sup>		5 DDI		8 DDI	
		CH <sup>3</sup>	SH	CH	SH	CH	SH
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	46.II $\bar{X}$	3	1	3	1	5	3
		2	3	2	3	4	5
		2.5	2	2.5	2	4.5	4
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	75.II $\bar{X}$	2	1	2	1.5	3	1.5
		0	1.4	0	1.4	0	1.4
		1	1.2	1	1.45	1.5	1.45
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	75.V $\bar{X}$	0	0	0	0	0	0
		2	0	2	0	2.5	0
		1	0	1	0	1.25	0
<i>Pestalotiopsis virgatula</i>	77.V $\bar{X}$	2	3	2	3	2.5	3
		0	0	0	0	0	0
		1	1.5	1	1.5	1.25	1.5
<i>Lasmenia</i> sp.	2.II $\bar{X}$	2.5	0	2.5	0	2.5	0
		3	0	3	0	3	0
		2.75	0	2.75	0	2.75	0
<i>Lasmenia</i> sp.	3.II $\bar{X}$	3	0	3	0	3	0
		3.5	0	3.5	0	3.5	0
		3.25	0	3.25	0	3.25	0
<i>Lasmenia</i> sp.	265.I $\bar{X}$	2	0	2	0	2.5	0
		2.5	0	2.5	0	3	0
		2.25	0	2.25	0	2.75	0

1. Todos los aislados evaluados causaron manchas necróticas con halo clorótico
2. DDI= Días después de inoculado
3. CH= Con herida y SH= Sin herida

En ambos tratamientos de *B. rhodina*, se observaron en el haz de la hoja manchas necróticas, circulares, color marrón, con halo clorótico sobre el punto de inoculación. En el envés de la hoja se observó la formación de estructuras reproductivas del hongo (Fig. 41). Los tres aislados de *P. virgatula* resultaron virulentos a hojas de rambután. Los aislados 75.II, 77.V y 75.V infectaron el tejido vegetal en ambos tratamientos (con y sin herida) (cuadro 7). El aislado más virulento fue el 75.II con un porcentaje de severidad promedio de 1.5% a los ocho días después de la inoculación (Fig. 42).



**Figura 41.** Manchas necróticas con halo clorótico causadas por *Botryosphaeria rhodina* (46. II) sobre la hoja de rambután a los 8 días después de la inoculación. En el envés de la hoja se observan los picnidios del hongo.

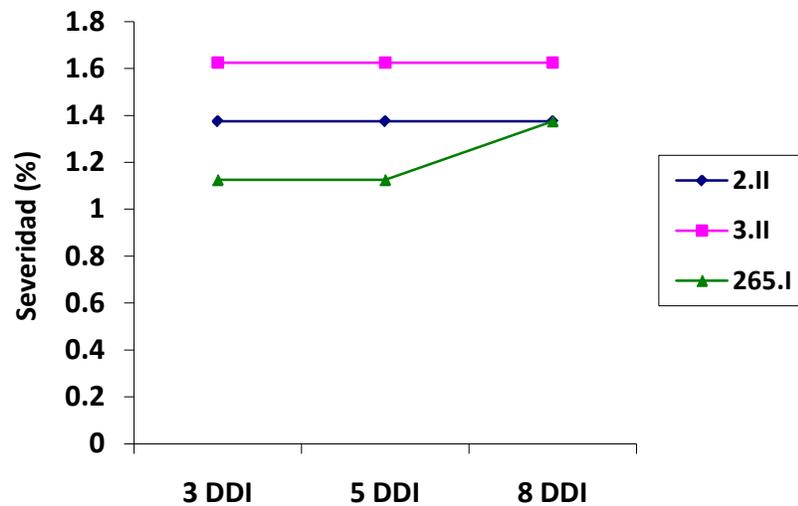


**Figura 42.** Promedio del porcentaje de severidad causada por los aislados de *Pestalotiopsis virgatula*.

En ambos tratamientos (con y sin herida) de *P. virgatula*, se observaron manchas necróticas circulares e irregulares con halo clorótico sobre la hoja de rambután, tres días después de la inoculación (Fig. 43).



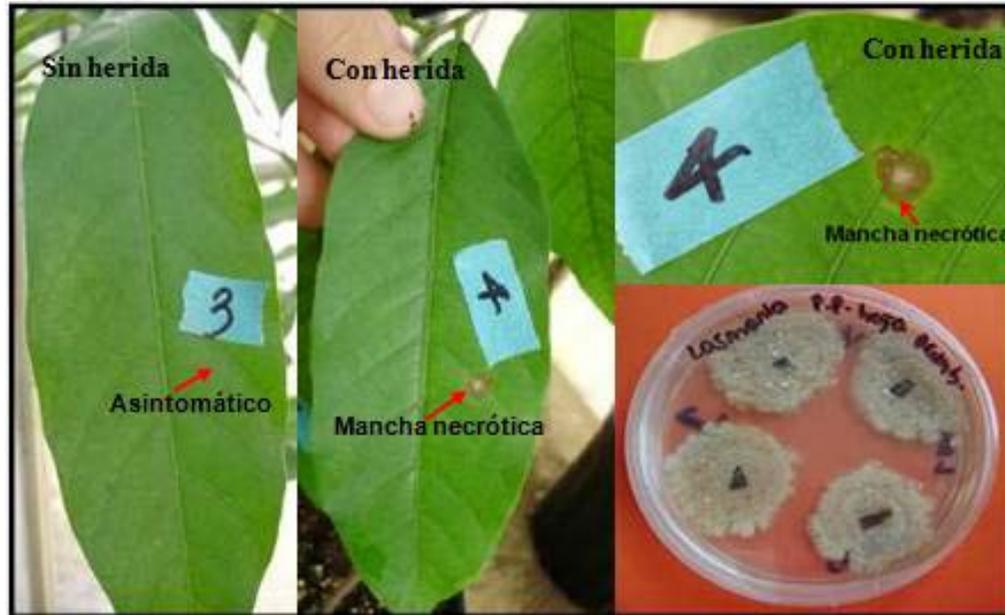
**Figura 43.** Manchas cloróticas con halo clorótico causadas por *Pestalotiopsis virgatula* (75.II) sobre la hoja de rambután tres DDI.



**Figura 44.** Promedio del porcentaje de severidad causado por tres aislados de *Lasmenia* sp.

De los tres aislados de *Lasmenia* sp. evaluados, el más virulento fue el 3.II con un porcentaje de severidad promedio de 1.63 %, ocho días después de la inoculación (Fig. 44). En los tres aislados evaluados, los tratamientos con incisión tres DDI fueron más virulentos que los tratamientos sin incisión, observándose sobre la hoja de rambután manchas necróticas con halo clorótico, circulares, color marrón y coloración blanca al

centro de la lesión. La condición de herida fue un factor determinante para la penetración de este hongo e infección en la hoja de rambután (Fig. 45).



**Figura 45.** Manchas necróticas con halo clorótico y centro blanco causadas por *Lasmenia* sp. (3.II) en hoja de rambután a los tres DDI. Reaislamiento de *Lasmenia* sp. en medio APDA.

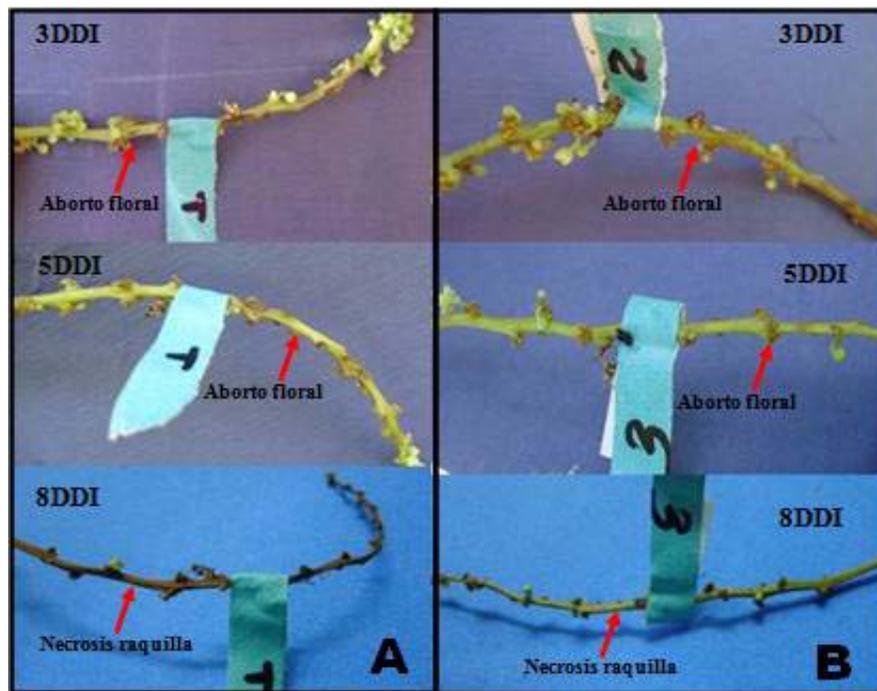
### 5.2.3.1.2 Inflorescencias

De los siete aislados evaluados, solo cuatro aislados fueron virulentos, siendo patogénicas las especies *B. rhodina*, *A. rigidiuscula*, *Lasmenia* sp y *Phoma* sp. Las especies *P. virgatula*, *F. chlamydosporum* y *P. longicolla* evaluadas, no fueron patogénicas a inflorescencias de rambután. El aislado 300.I de *Lasmenia* sp. presentó el mayor porcentaje de severidad a los ocho días después de la inoculación con respecto a los otros aislados evaluados (Cuadro 8). *Lasmenia* sp. produjo necrosis de la raquilla y aborto floral a los tres DDI, en tratamientos con herida y sin herida se observó un 100% de colonización de la raquilla a los ocho DDI (Fig. 46).

**Cuadro 8.** Severidad (%) de la enfermedad en inflorescencias de rambután (*N. lappaceum*), causadas por diferentes especies de hongos. Datos tomados a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

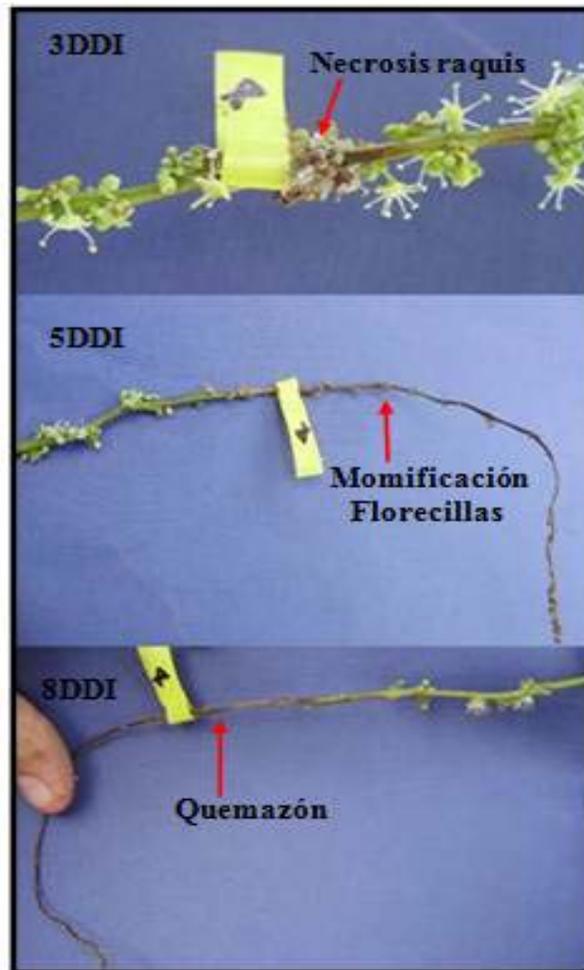
PATÓGENO	AISLADO	SÍNTOMAS	SEVERIDAD (%)					
			3 DDI <sup>1</sup>		5 DDI		8 DDI	
			CH <sup>2</sup>	SH	CH	SH	CH	SH
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	289.V	Necrosis, momificación de flores y quemazón de la raquilla $\bar{X}$	5	0	10	0	50	0
			10	0	60	0	60	0
			7.5	0	35	0	55	0
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	48.IV	Necrosis de las florecillas y marchitez de la raquilla $\bar{X}$	5	0	30	10	80	60
			8	0	20	10	80	60
			6.5	0	25	10	80	60
<i>Lasmenia</i> sp.	300.I	Necrosis de la raquilla y aborto floral $\bar{X}$	80	70	80	80	100	100
			40	70	80	80	100	100
			60	70	80	80	100	100
<i>Phoma</i> spp.	264.IV	Putrición blanda a lo largo de la raquilla, aborto y momificación floral $\bar{X}$	60	0	80	0	100	0
			30	0	80	0	80	0
			45	0	80	0	90	0

1. DDI. Días después de inoculado 2. CH= Con herida y SH= Sin herida



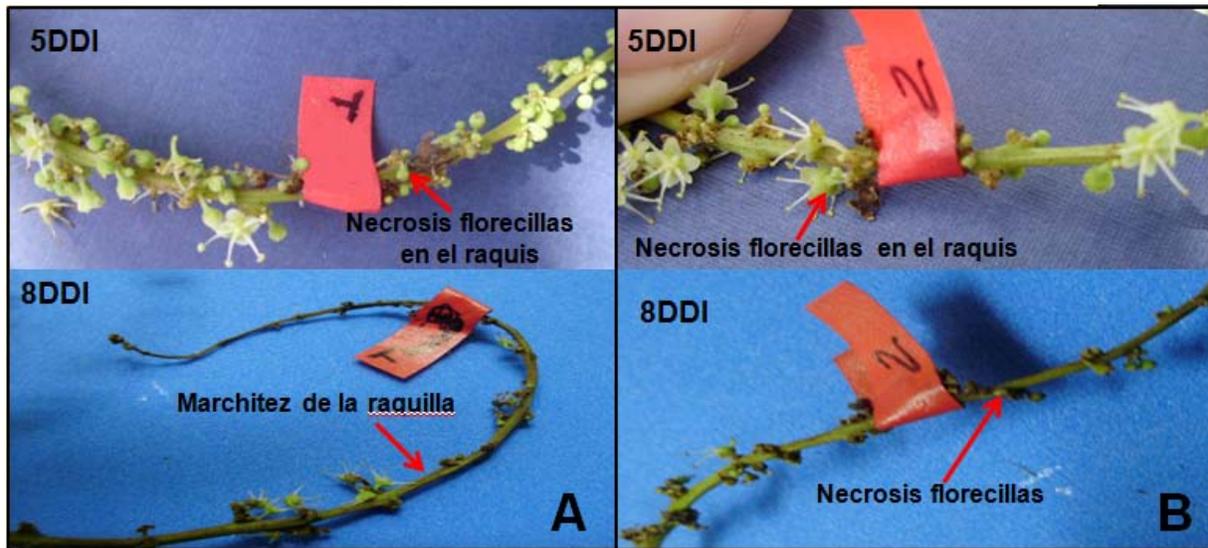
**Figura 46.** Necrosis y aborto floral observado en pruebas de patogenicidad con *Lasmenia* sp. (300.I) en inflorescencia de rambután. (A) Tratamientos con herida y (B) tratamientos sin herida.

*B. rhodina* (289.V) infectó el tejido vegetal solamente en los tratamientos con herida mostrando un porcentaje promedio de severidad del 55% a los ocho DDI (Cuadro 8). Esta especie no fue patogénica en los tratamientos sin herida. Los síntomas de la enfermedad comenzaron a manifestarse con una necrosis en el punto de inoculación con presencia de micelio blanco en la raquilla tres días después de la inoculación. A los cinco días se observa necrosis y momificación de las florecillas. A los ocho días después de la inoculación las florecillas momificadas se cayeron y se observó la quemazón de la raquilla (Fig. 47)



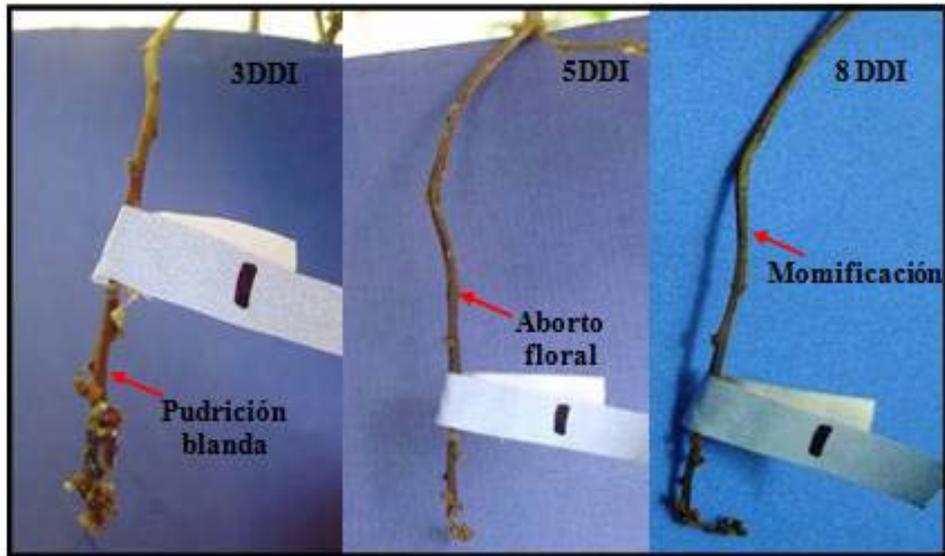
**Figura 47.** Necrosis, momificación de flores y quemazón de la raquilla causada por *Botryosphaeria rhodina* (289.V) en inflorescencia de rambután en tratamientos con herida a los 3,5 y 8 días después de la inoculación.

*A. rigidiuscula* causó necrosis de las florecillas a lo largo del raquilla cinco días después de la inoculación en todos los tratamientos evaluados. Se observó un 80% de colonización de los tejidos a los ocho días después de la inoculación, en los tratamientos con herida causando marchitez de la raquilla. Los tratamientos sin herida mostraron un 60% de colonización de los tejidos con necrosis de las florecillas en el punto de inoculación (Fig. 48).



**Figura 48.** Necrosis de las florecillas y marchitez de la raquilla causada por *Albonectria rigidiuscula* (48.IV) en inflorescencia de rambután (A) Tratamiento con herida y (B) Tratamiento sin herida.

*Phoma* sp. (264.IV) mostró un 45% de severidad en las inflorescencias de rambután a los tres días después de la inoculación en los tratamientos con herida. A los cinco días el porcentaje de severidad aumentó al 80% cubriendo el 100% de la raquilla ocho DDI (Cuadro 8). Los síntomas de la enfermedad comenzaron a manifestarse desde los tres DDI presentándose una pudrición blanda a lo largo de la raquilla. A los cinco días se observó aborto de la mayoría de las florecillas y a los ocho días la momificación de las florecillas restantes y del tejido vegetal (Fig. 49)



**Figura 49.** Pudrición blanda a lo largo de la raquilla, aborto y momificación floral causada por *Phoma* sp. (264.IV) en inflorescencias de rambután con herida a los 3, 5 y 8 días después de inoculación.

### 5.2.3.1.3 Frutos

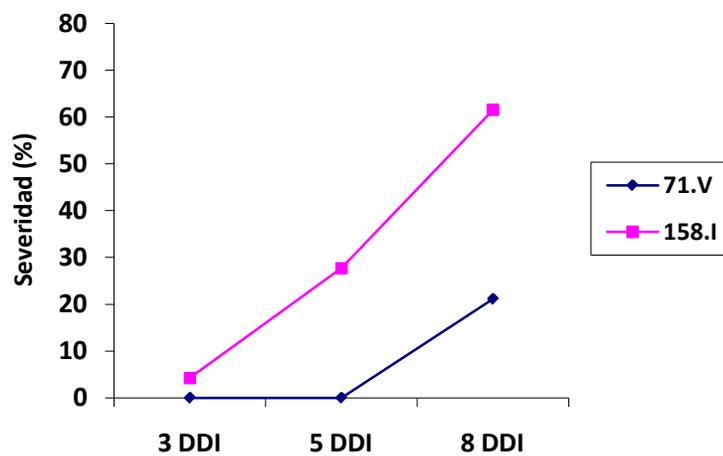
Todos los aislados de hongos evaluados fueron virulentos a las frutas de rambután, siendo patogénicos los hongos: *B. rhodina*, *C. pseudospathiphylli*, *P. virgatula*, *G. cingulata*, *F. chlamyosporum*, *L. clusiae*, *Lasmenia* sp., y *P. longicolla*. Los aislados más virulentos fueron el 158.I de *B. rhodina*, el 7.IV de *C. pseudospathiphylli*, el 7.I de *L. clusiae*, los aislados 278.II y 275.II de *Lasmenia* sp. cubriendo el 100% de cubrimiento de la fruta en un término de ocho días después de la inoculación (cuadro 9).

**Cuadro 9.** Severidad (%) de la enfermedad en frutas de rambután (*N. lappaceum*) causada por diferentes especies de hongos. Datos tomados a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

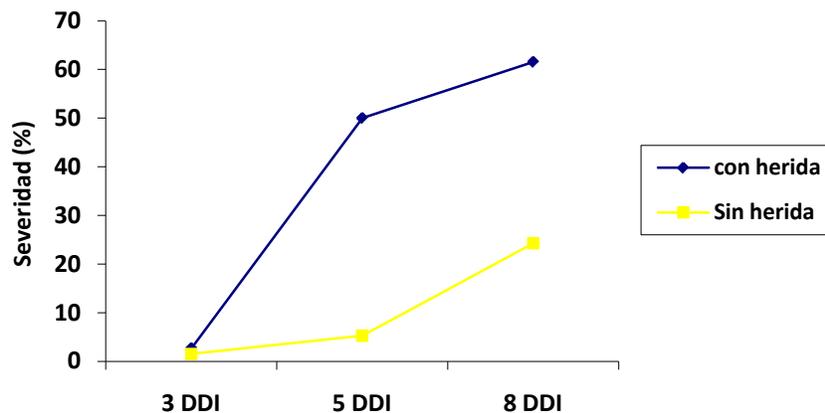
PATÓGENO	AISLADO	SEVERIDAD (%)					
		3 DDI <sup>4</sup>		5 DDI		8 DDI	
<i>Botryosphaeria rhodina</i> <sup>1</sup>	71.V	CH <sup>5</sup>	SH	CH	SH	CH	SH
		0	0	0	5.2	23.08	25.5
	$\bar{x}$	0		2.6		24.29	
	158.I	5.38	3.08	50	5.38	100	23.08
	$\bar{x}$	4.23		27.69		61.54	
<i>Calonectria pseudospathiphylli</i> <sup>1</sup>	7.III	7.69	11.54	10.37	12.31	23.08	12.31
	$\bar{x}$	9.61		11.34		17.69	
	7.IV	12.31	10.77	15.38	23.08	100	80.77
	$\bar{x}$	11.54		19.23		90.38	
<i>Fusarium chlamydosporum</i> <sup>1</sup>	218.II	7.69	0	12.31	0	38.46	0
	$\bar{x}$	3.84		6.15		19.23	
<i>Glomerella cingulata</i> <sup>2</sup>	147.II	0	0	0	1.54	23.08	19.23
	$\bar{x}$	0		0.77		21.15	
	151.II	0	0	3.08	15.38	46.15	15.38
	$\bar{x}$	0		9.23		30.76	
<i>Leuconectria clusiae</i> <sup>3</sup>	7.I	12.31	12.31	25	25	100	100
	$\bar{x}$	12.31		25		100	
<i>Lasmenia sp.</i> <sup>1</sup>	278.II	0	0	50	19.23	100	19.23
	$\bar{x}$	0		34.61		59.61	
	275.II	0	0	38.43	19.23	100	25
	$\bar{x}$	0		28.83		62.5	
<i>Pestalotiopsis virgatula</i> <sup>1</sup>	305.II	7.69	0	15.38	0	38.46	0
	$\bar{x}$	3.84		7.69		19.23	
	79.V	1.54	0	13.85	0	15.38	0
	$\bar{x}$	0.77		6.92		7.69	
<i>Phomopsis longicolla</i> <sup>1</sup>	66.III	0	0	0	0	0	0
	$\bar{x}$	0		0		0	
	175.III	3.58	1.54	13.85	3.08	76.92	15.38
	$\bar{x}$	2.56		8.46		46.15	

1. Necrosis en la fruta de rambután; 2. Pudrición de la fruta de rambután; 3. Colonización micelial del fruto; 4. DDI. Días después de inoculado; 5. CH= Con herida y SH= Sin herida

De los aislados *B. rhodina* evaluados, el más virulento fue el aislado 158.I con porcentaje de severidad promedio con y sin herida de 61.54% a los ocho días después de inoculado en comparación con el aislado 71.V con un porcentaje promedio de severidad de 21.15% (Fig. 50). La condición de herida fue un factor determinante en la virulencia de *B. rhodina*. El porcentaje de severidad en el tratamiento con herida fue mayor en comparación del tratamiento sin herida en los dos aislados evaluados (Fig. 51).



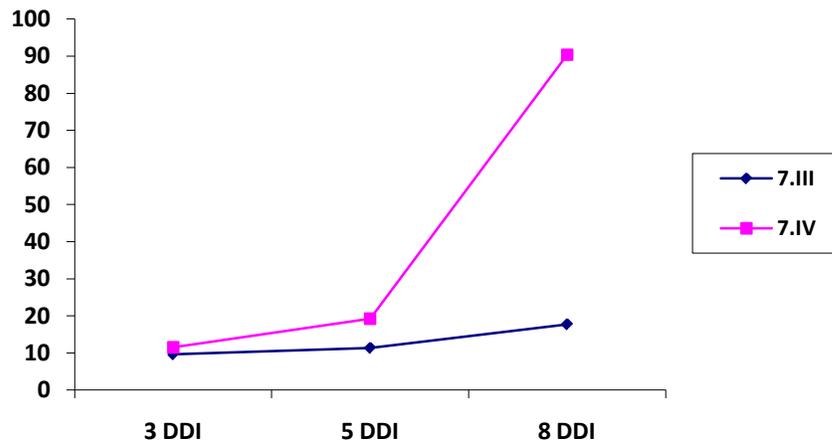
**Figura 50.** Promedio del porcentaje de severidad promedio para los aislados de *Botryosphaeria rhodina*.



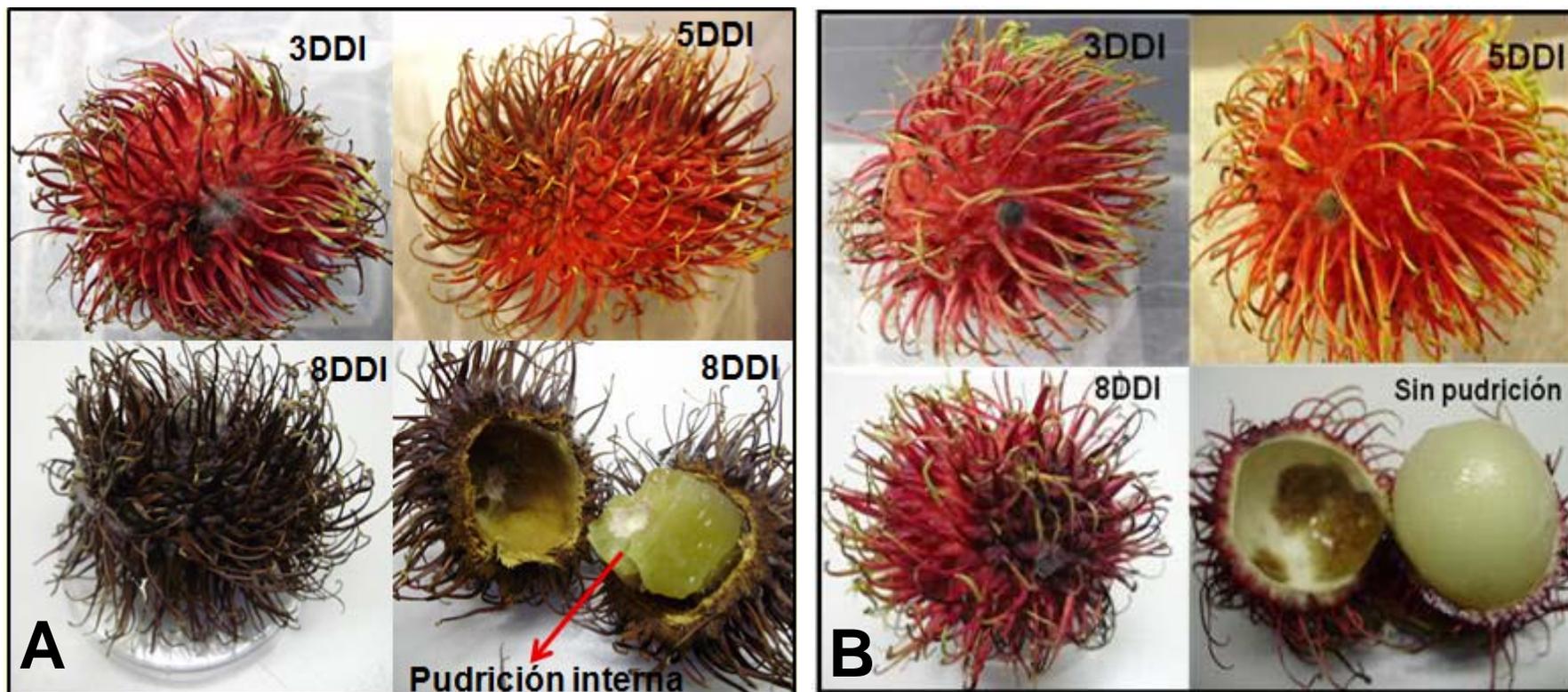
**Figura 51.** Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de *Botryosphaeria rhodina* en tratamientos con y sin herida.

*Botryosphaeria rhodina* produjo necrosis en la fruta de rambután. A los tres días después de la inoculación se observó el crecimiento del micelio sobre la fruta en los tratamientos con herida. Luego de cinco días, se observó un cambio de coloración de una parte de la fruta tornándose de rojo a marrón con presencia de micelio grisáceo en el punto de inoculación. A los ocho días toda la fruta se tornó necrótica y se observó pudrición interna en la pulpa, cambiando de blanca y translúcida a marrón claro y opaca (Fig. 52 A). En los tratamientos sin herida, luego de los ocho días después de la inoculación se observó necrosis de la fruta de rambután, presentando un cambio en la coloración de rojo a marrón alrededor y en el punto de inoculación. Se observó necrosis en el interior de la cáscara de la fruta, sin embargo, la pulpa mostró su coloración normal (blanca y translúcida) (Fig. 52 B).

De los dos aislados de *C. pseudospathiphylli* evaluados, el aislado 7.IV fue el más virulento con un porcentaje de severidad promedio de 90.38% en frutas con y sin herida a los ocho días después de la inoculación en comparación con el aislado 7.III. Este último mostró un porcentaje de severidad promedio de 17.69% (Fig. 53)

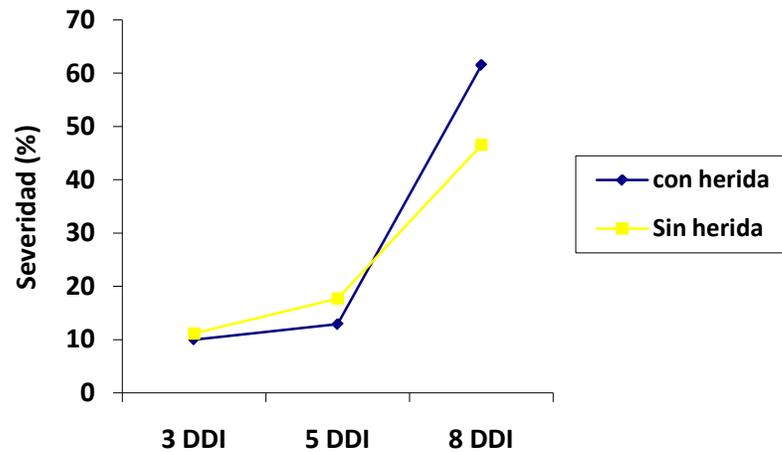


**Figura 53.** Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de *Calonectria pseudospathiphylli*.



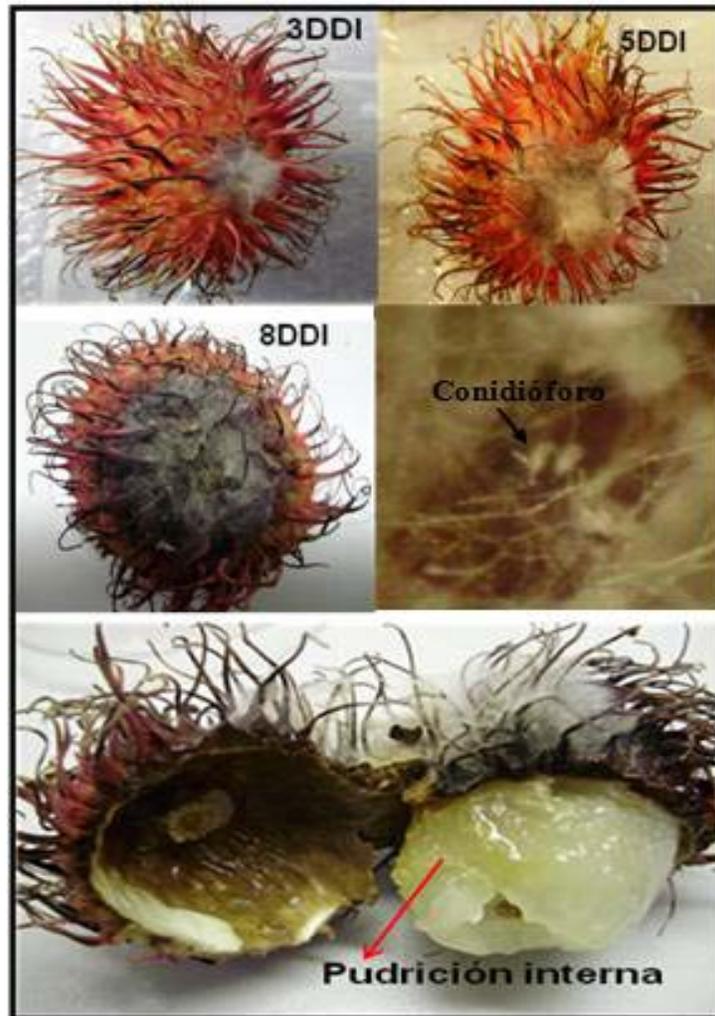
**Figura 52.** Necrosis de la fruta de rambután ocasionada por *Botryosphaeria rhodina* a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación. (A) Tratamientos con herida y (B) tratamientos sin herida.

El tratamiento con herida no fue un factor determinante en la patogenicidad de *C. pseudospathiphylli*. El hongo penetró e infectó las frutas de rambután en los tratamientos con y sin herida. A los ocho días después de la inoculación el tratamiento con herida mostró un porcentaje de severidad promedio mayor (61.54%) con respecto al porcentaje de severidad del tratamiento sin herida (46.54%) (Fig. 54).



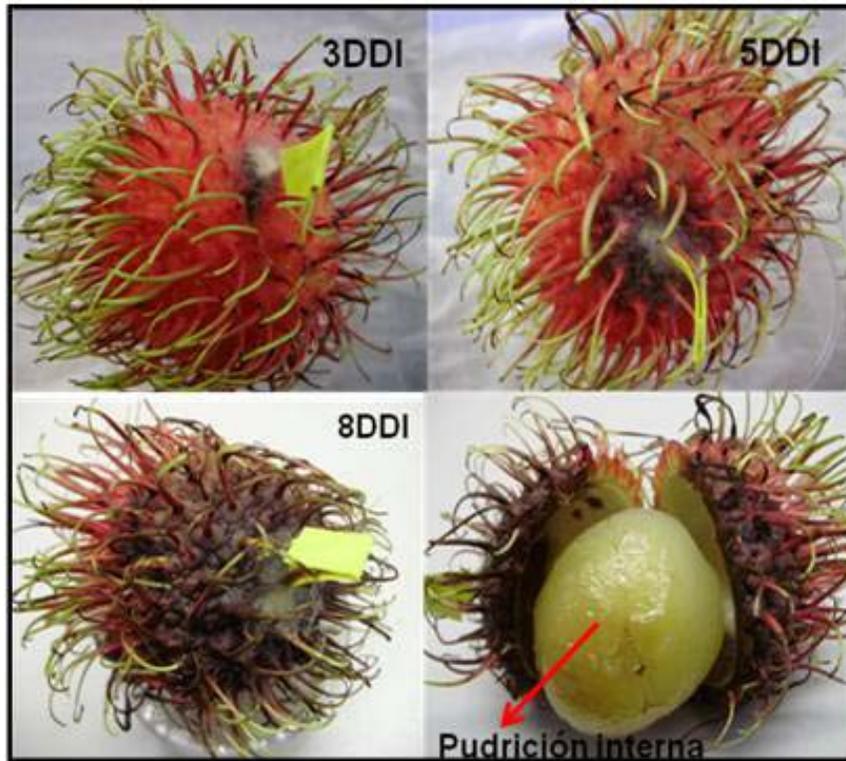
**Figura 54.** Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de *Calonectria pseudospathiphylli* en los tratamientos con y sin herida.

*Calonectria pseudospathiphylli* produjo necrosis en la fruta de rambután. A los tres días después de la inoculación ambos tratamientos (con y sin herida) mostraron crecimiento micelial blanco sobre la fruta. A los cinco días, la fruta presentó un cambio de coloración de rojo a marrón en el punto de inoculación y el micelio del hongo se torna amarillo. Luego de ocho días toda la fruta se torna color marrón, el micelio cubrió toda la fruta produciéndose los conidióforos sobre el pelo del rambután. Internamente se observó la pudrición de la pulpa con una coloración marrón clara y opaca (Fig. 55).



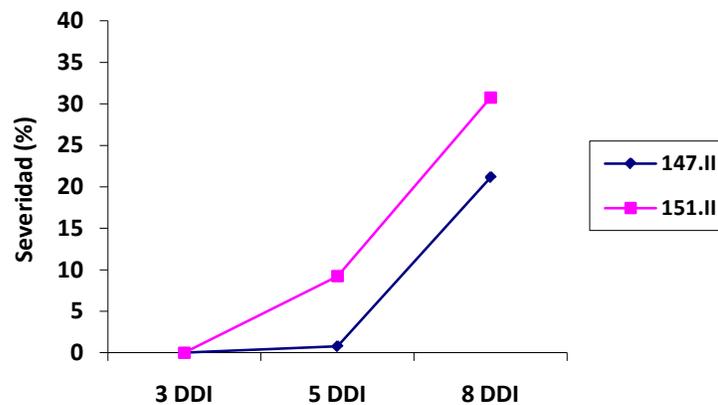
**Figura 55.** Necrosis de fruta de rambután ocasionada por *Calonectria pseudospathiphylli* en tratamientos con y sin herida a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

*Fusarium chlamydosporum* (218.II) mostró una severidad de 7.69%, 12.31% y 38.46% en frutas de rambután a los tres, cinco y ocho días después de la inoculación respectivamente, en el tratamiento con herida (Cuadro 9). A los tres días, se observó crecimiento micelial sobre la fruta. A los cinco días, se tornó necrótico en el punto de inoculación con producción de conidias sobre el tejido vegetal. La fruta de coloración rojiza se tornó violeta con presencia de micelio amarillo sobre el tejido. A los ocho días el 40% de la fruta es afectada, observándose un cambio en el color de la pulpa de blanco y translúcido a marrón claro y opaco (Fig. 56)



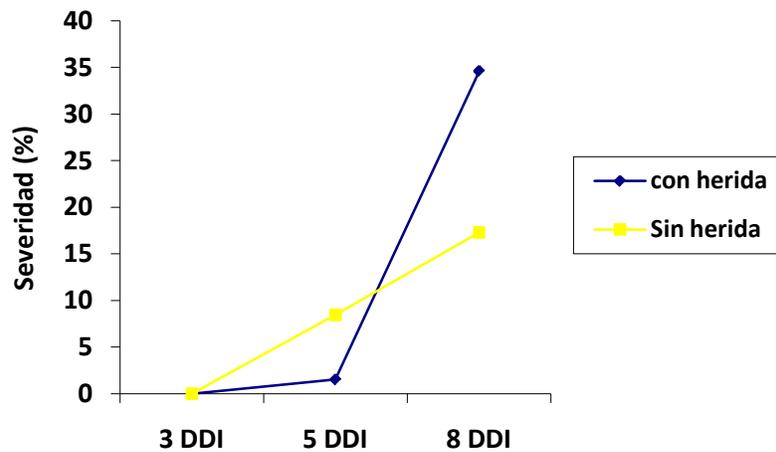
**Figura 56.** Necrosis de fruta de rambután ocasionada por *Fusarium chlamydosporum* (218.II) en los tratamientos con herida a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

De los aislados evaluados de *G. cingulata*, el más virulento fue el aislado 151.II. Este presentó un porcentaje de severidad promedio de 30.76% en tratamientos con y sin herida ocho días después de la inoculación en comparación con el aislado 147.II. Este último mostró un porcentaje promedio de severidad de 21.15% (Fig. 57)



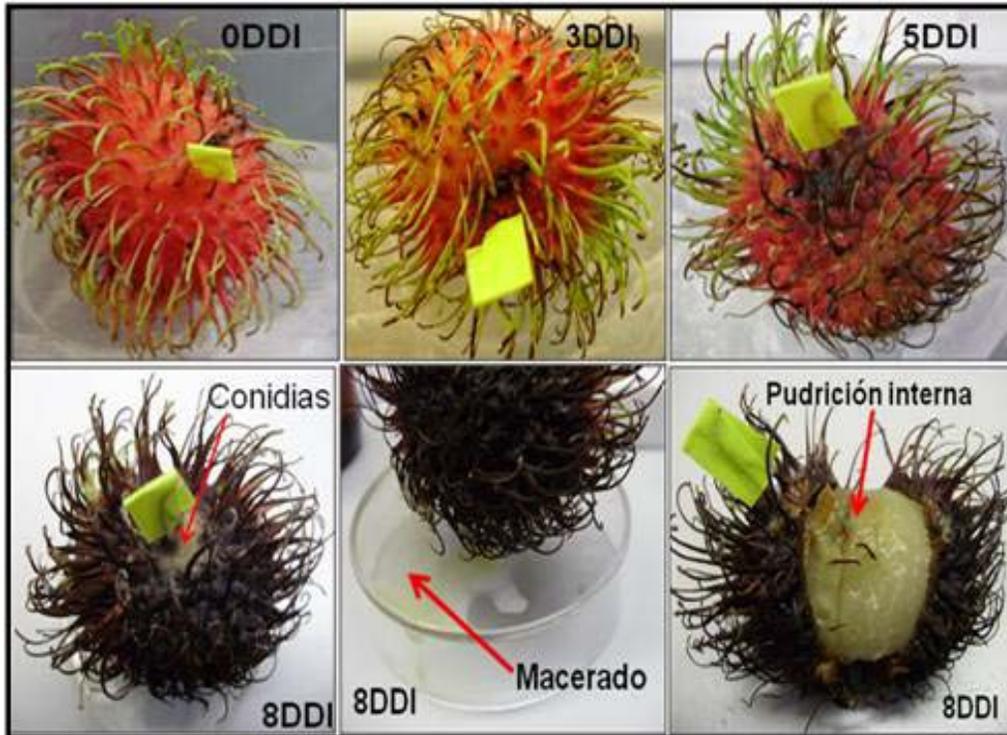
**Figura 57.** Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de *Glomerella cingulata*.

El tratamiento con herida no fue un factor determinante en la patogenicidad de *G. cingulata*. El patógeno penetró e infectó el fruto de rambután en los tratamientos con y sin herida. A los tres y cinco días después de la inoculación se observa similitud en el porcentaje de severidad en ambos tratamientos (2 a 8%). Sin embargo, ocho días después de la inoculación el tratamiento con herida fue más virulento (34.61%) con respecto al tratamiento sin herida (17.3%) (Fig. 58).



**Figura 58.** Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de *Glomerella cingulata* en tratamientos con y sin herida.

*Glomerella cingulata* produjo pudrición en la fruta de rambután. A los tres días después de inoculación, no se observaron síntomas de la enfermedad para ambos tratamientos con y sin herida. A los cinco días la fruta presentó un cambio de coloración de rojo oscuro a rojo pálido en el punto de inoculación. A los ocho días toda la fruta cambió a color marrón, no desarrolló micelio aéreo sobre el tejido vegetal. En el punto de la incisión el hongo produjo los acérvulos, el tejido se maceró y la fruta liberó un exudado. Se observó un cambio de coloración interna en la pulpa de blanca y translúcida a marrón clara y opaca (Fig. 59).



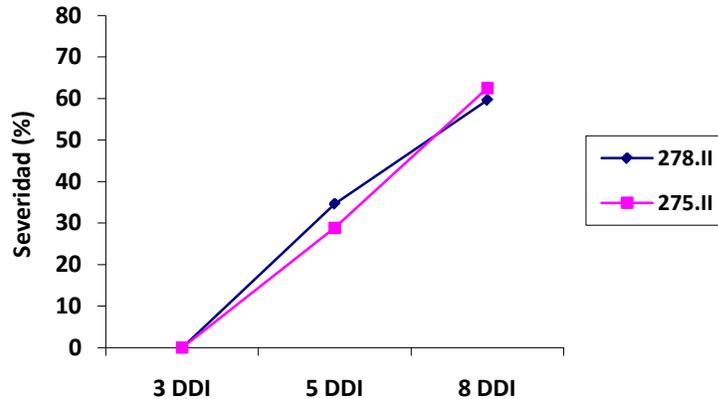
**Figura 59.** Pudrición de la fruta de rambután ocasionada por *Glomerella cingulata* a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

*Leuconectria clusiae* (7.I) fue virulento a la fruta de rambután con un 100% de colonización del frutos a los ocho días después de inoculación en los tratamientos con y sin herida (Cuadro 7). Desde los tres días, se observó crecimiento micelial blanco sobre la fruta sin presencia de necrosis (Fig. 60)



**Figura 60.** Colonización micelial de la fruta de rambután ocasionada por *Leuconectria clusiae* a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

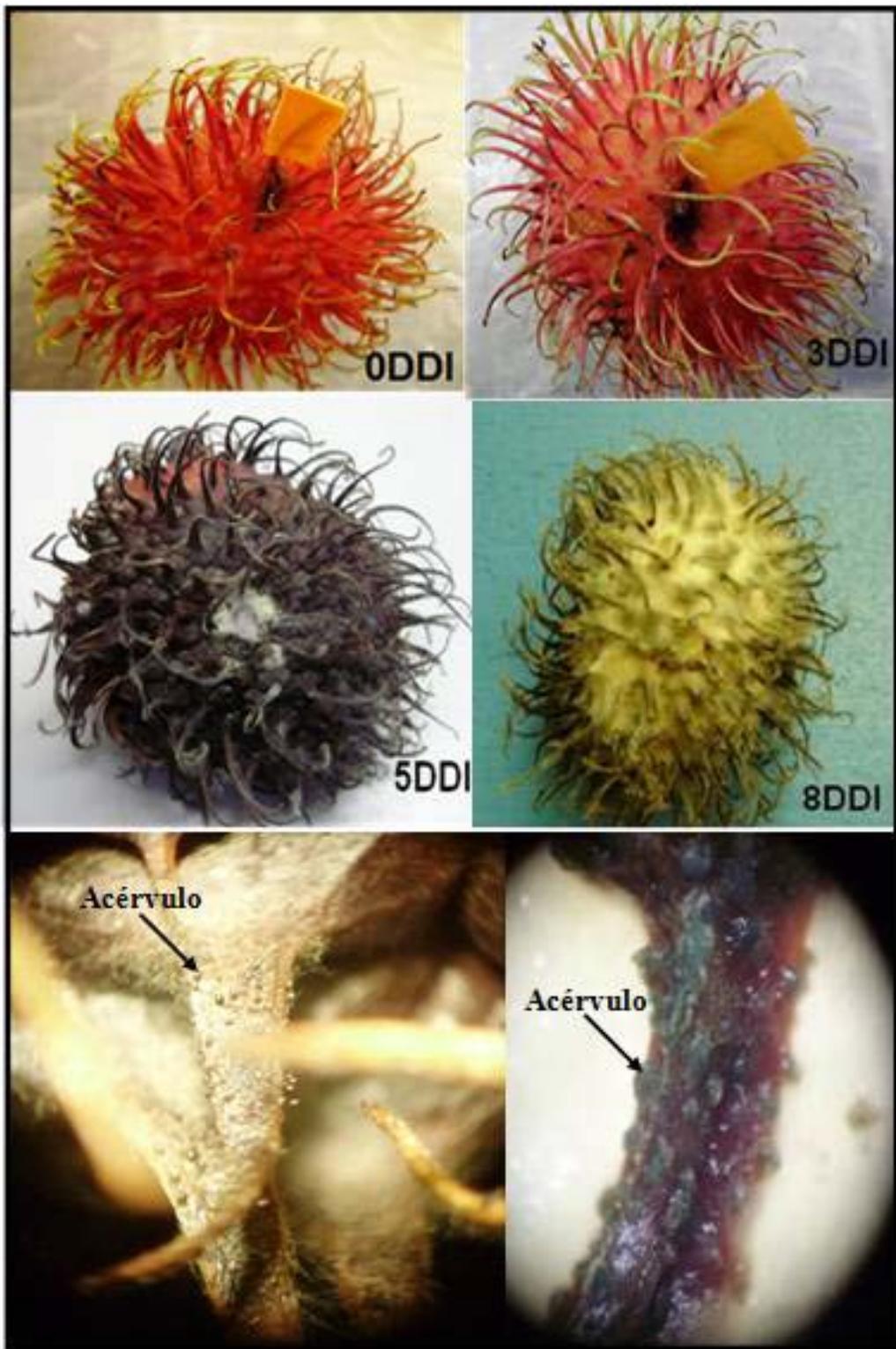
*Lasmenia* sp. (aislados 278.II y 275.II) resultaron patogénicos a la fruta de rambután. A los cinco y ocho días después de la inoculación se observó necrosis en el tejido vegetal con un porcentaje de severidad promedio similar para los dos aislados evaluados (59 a 62%) en tratamientos con herida y sin herida (Fig. 61)



**Figura 61.** Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de *Lasmenia* sp.

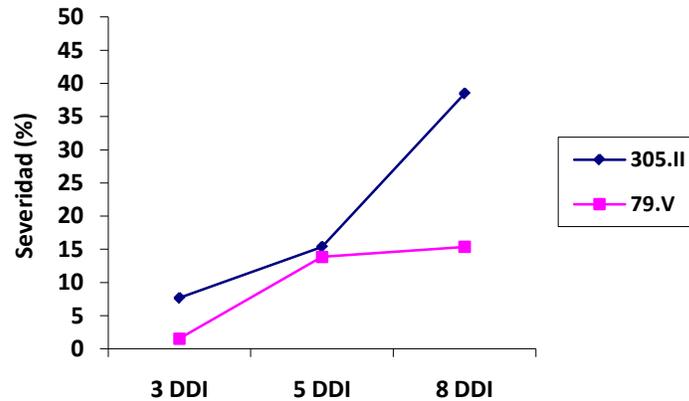
El tratamiento con herida fue un factor determinante en la patogenicidad de *Lasmenia* sp. El porcentaje de severidad en el tratamiento con herida fue mayor en comparación del tratamiento sin herida en los dos aislados evaluados (Cuadro 9).

*Lasmenia* sp. produjo necrosis en la fruta de rambután aunque inicialmente a los tres días después de la inoculación no se observaron síntomas de la enfermedad en ambos tratamientos (con y sin herida). A los cinco días, la fruta presentó un cambio de coloración de rojo a marrón en el punto de inoculación sin presencia de micelio aéreo sobre el tejido vegetal. A los ocho días toda la fruta cambió a color rosa, el micelio cubrió toda la fruta produciéndose los acérvulos sobre el pelo del rambután (Fig. 62).



**Figura 62.** Necrosis de la fruta de rambután ocasionada por *Lasmenia* sp. a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

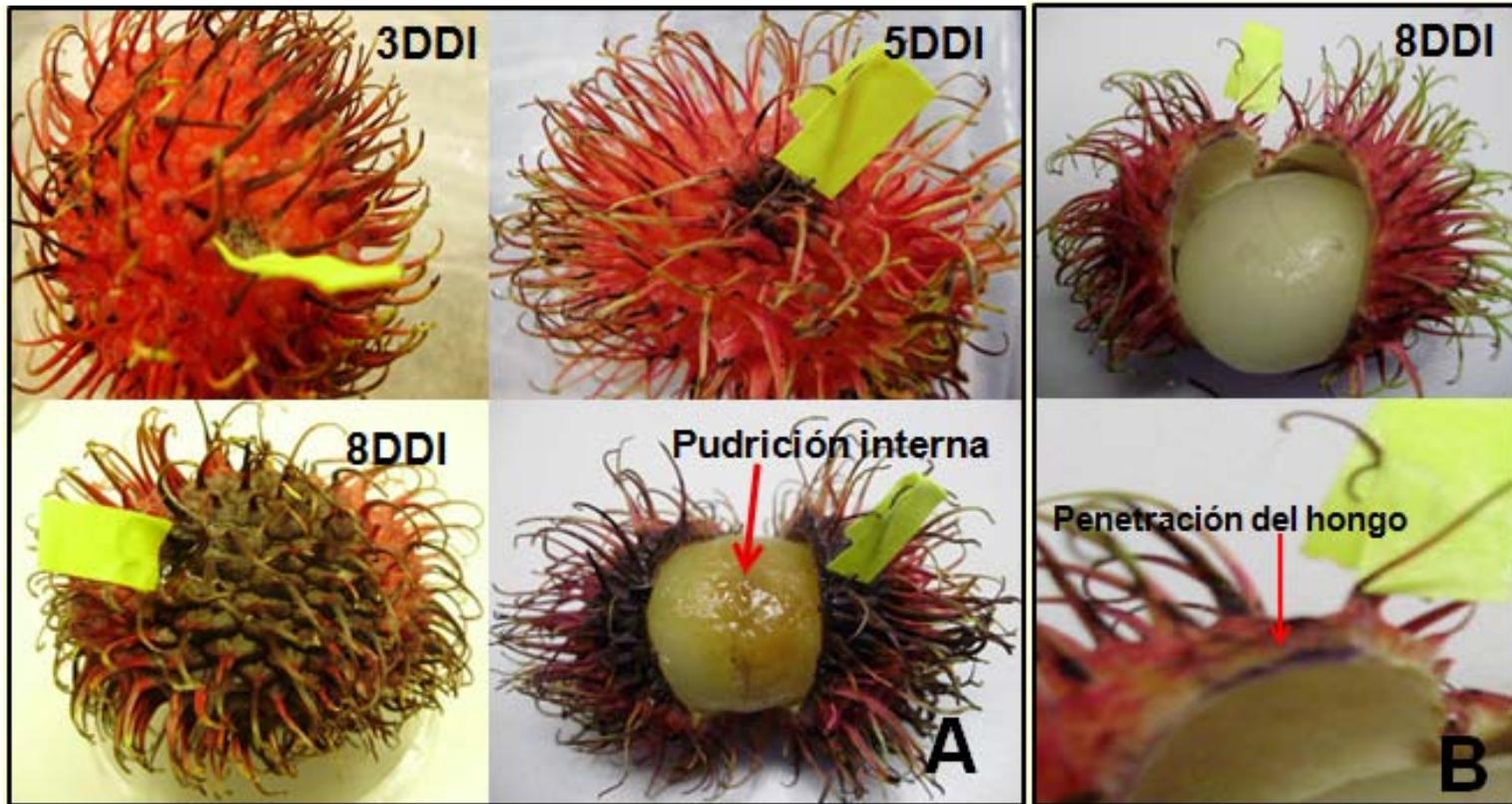
De los dos aislados evaluados de *P.virgatula*, el más virulento fue el aislado 305.II con un porcentaje de severidad promedio de 38.46% a los 8 días después de inoculación en tratamientos con heridas en comparación con el aislado 79.V (15.38%) (Fig. 63)



**Figura 63.** Promedio del porcentaje de severidad para los aislados de *Pestalotiopsis virgatula* en tratamientos con herida.

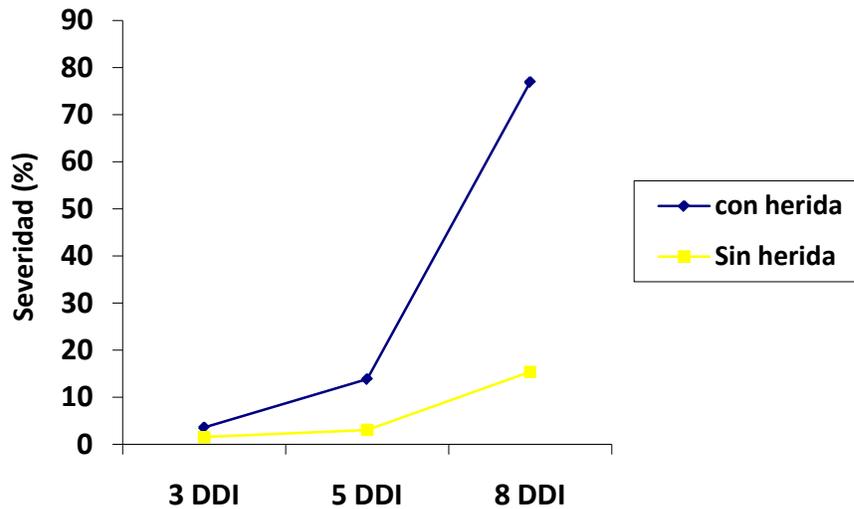
Sólo los tratamientos con herida en los dos aislados evaluados infectaron el tejido vegetal produciendo necrosis en el fruto del rambután a los 5 DDI. En los tratamientos con herida se observó un cambio de coloración de la fruta de rojo a marrón en el punto de inoculación aunque no se observó micelio aéreo cubriendo el tejido vegetal. A los 8 días el 40% de la fruta cambió de color y se observó pudrición interna en la pulpa (Fig. 64 A).

Los tratamientos sin herida no manifestaron síntomas visibles de la enfermedad, pero, al abrir la fruta se observó la penetración del hongo en la cáscara, aunque no se observó pudrición interna de la pulpa (Fig. 64 B).



**Figura 64.** Necrosis de fruta de rambután ocasionada por *Pestalotiopsis virgatula* a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación. (A) Tratamiento con herida y (B) tratamiento sin herida.

*Phomopsis longicolla* (175.III) resultó patogénico a las frutas de rambután. Se observó un mayor porcentaje de severidad promedio en frutos con herida a los 3, 5 y 8 DDI (Fig. 65)



**Figura 65.** Promedio del porcentaje de severidad de *Phomopsis longicolla* (175.III) en tratamientos con y sin herida.

*Phomopsis longicolla* produjo necrosis en la fruta de rambután. Se comenzaron a observar los primeros síntomas de la enfermedad a los 5 días después de inoculación en tratamientos con y sin herida. Se observó, un cambio en la coloración de la fruta de rojo a marrón en el punto de inoculación con presencia de micelio aéreo color blanco sobre el tejido vegetal. A los 8 días el 80% de fruta cambió a marrón y se observó pudrición interna en la pulpa (Fig. 66).



**Figura 66.** Necrosis de la fruta de rambután causada por *Phomopsis longicolla* a los 3, 5 y 8 días después de inoculación.

### 5.2.3.2 Pruebas en longán

A continuación se presentan los resultados de las pruebas de patogenicidad en inflorescencias y frutos de longán. Los aislados evaluados en las hojas no resultaron patogénicos.

#### 5.2.3.2.1 Inflorescencias

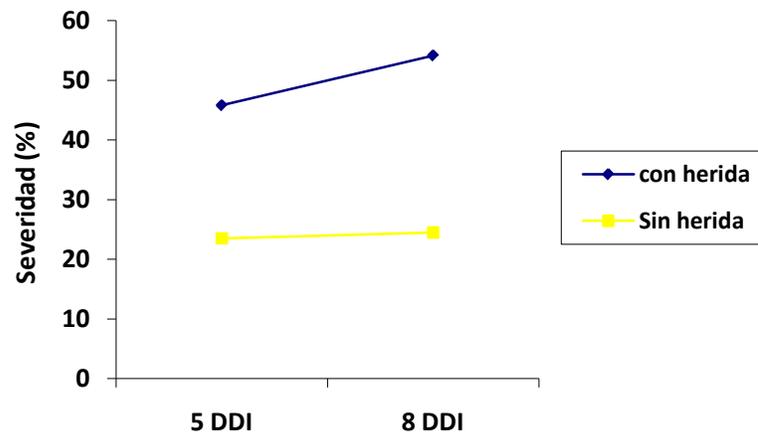
De los 13 aislados evaluados 5 resultaron virulentos a las inflorescencias de longán, siendo patogénicas las especies *B. rhodina*, *A. rigidiuscula*, *F. culmorum*, *P.clavispora* y *Phoma* sp. El mayor porcentaje de severidad lo produjo *B. rhodina* (81.I) a los 8 días después de la inoculación con respecto a los otros aislados evaluados (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Severidad (%) de la enfermedad en inflorescencias de longan (*D. longan*) causada por diferentes especies de hongos. Datos tomados a los 3, 5 y 8 días después de la inoculación.

PATÓGENO <sup>1</sup>	AISLADO	SÍNTOMAS	SEVERIDAD (%)			
			5 DDI <sup>2</sup>		8 DDI	
<i>Botryosphaeria rhodina</i>	81.I	Muerte de florecillas y quemazón de la raquilla $\bar{X}$	CH <sup>3</sup>	SH	CH	SH
			41.67	23	50	23
			50	24	58.33	26
			45.83	23.5	54.16	24.5
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	229.II	Marchitez de la raquilla y necrosis de las florecillas $\bar{X}$	3.33	0	50	0
			3.33	0	50	0
			3.33	0	50	0
			10	0	40	0
<i>Fusarium culmorum</i>	245.VI	Marchitez de la raquilla y necrosis de las florecillas $\bar{X}$	10	0	45	0
			10	0	42.5	0
			14.17	8.33	14.17	8.33
			25	4.17	25	5
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	236.V	Cancro, necrosis de las florecillas, manchas necróticas irregulares y quemazón $\bar{X}$	19.58	6.25	39.17	6.67
			10.83	5.33	33.33	8.5
			8.33	10	40	12.5
			9.58	7.66	36.66	10.5
<i>Phoma</i> spp.	236.I	Cancro, momificación y necrosis de la raquilla $\bar{X}$	10.83	5.33	33.33	8.5
			8.33	10	40	12.5
			9.58	7.66	36.66	10.5

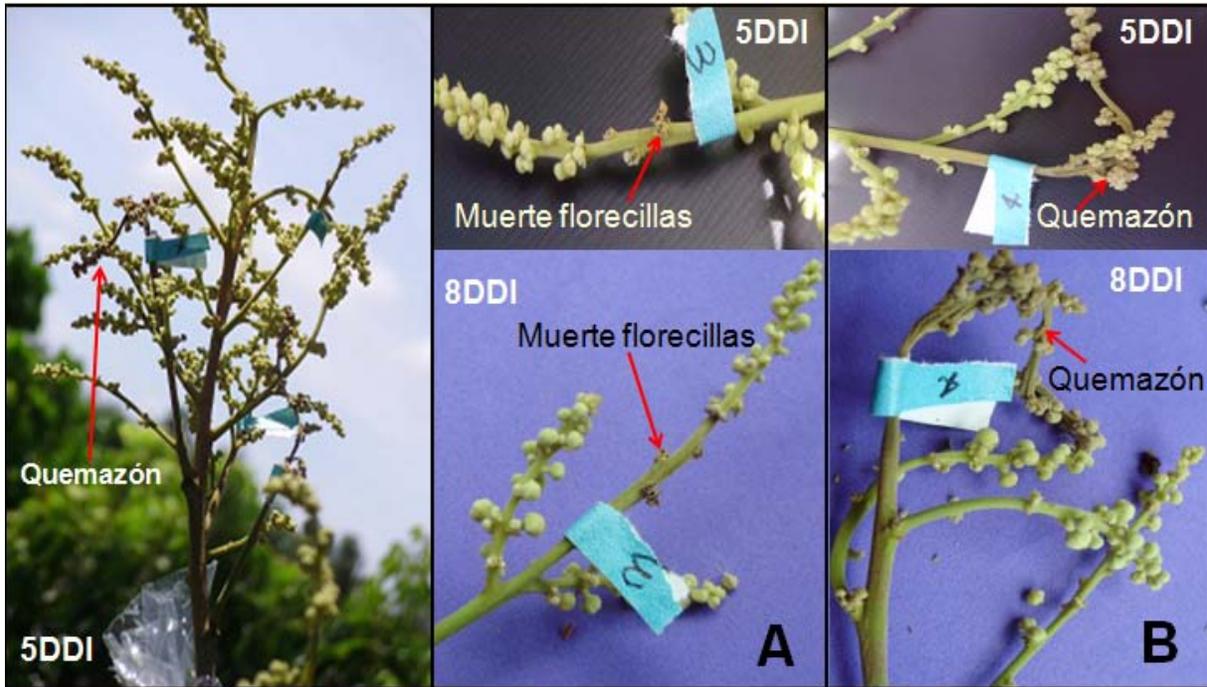
1. Los patógenos fueron inoculados con disco de micelio de 5 mm de diámetro
2. DDI. Días después de inoculado
3. CH= Con herida y SH= Sin herida

*Botryosphaeria rhodina* (81.I) resultó patogénica en las inflorescencias de longán en tratamientos con y sin herida. El porcentaje de severidad fue mayor en los tratamientos con herida (Fig. 67).



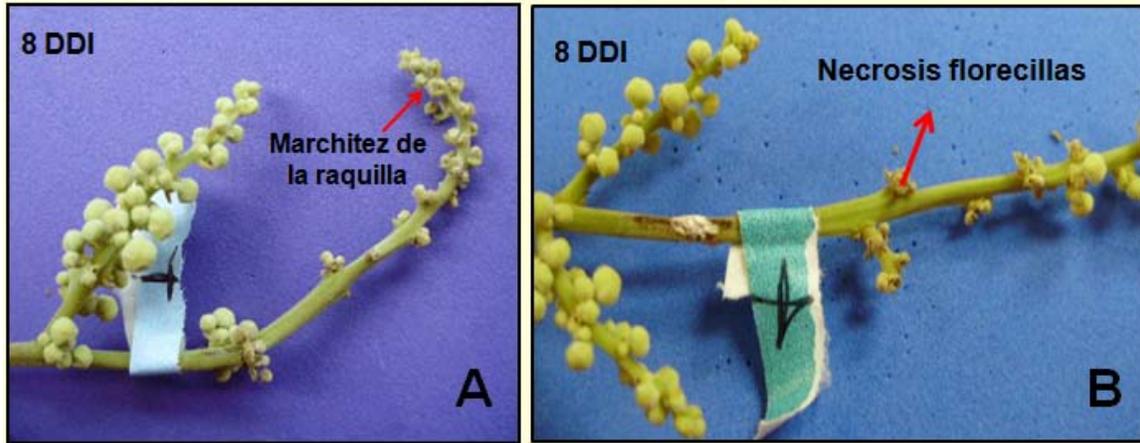
**Figura 67.** Promedio del porcentaje de severidad de *Botryosphaeria rhodina* (81.I) en tratamientos con y sin herida.

*Botryosphaeria rhodina* produjo dos tipos de síntomas en las inflorescencias de longán. A los cinco y ocho días después de inoculado. Se observó en el punto de inoculación la muerte de las florecillas a lo largo del raquis en los tratamientos sin herida. Para los tratamientos con herida, desde los 5 días se observó quemazón en la inflorescencia (Fig. 68).



**Figura 68.** Muerte de florecillas y quemazón de la raquilla causada por *Botryosphaeria rhodina* (81.I) en inflorescencia de longán a los 5 y 8 días después de la inoculación. (A) Tratamientos sin herida y (B) tratamientos con herida.

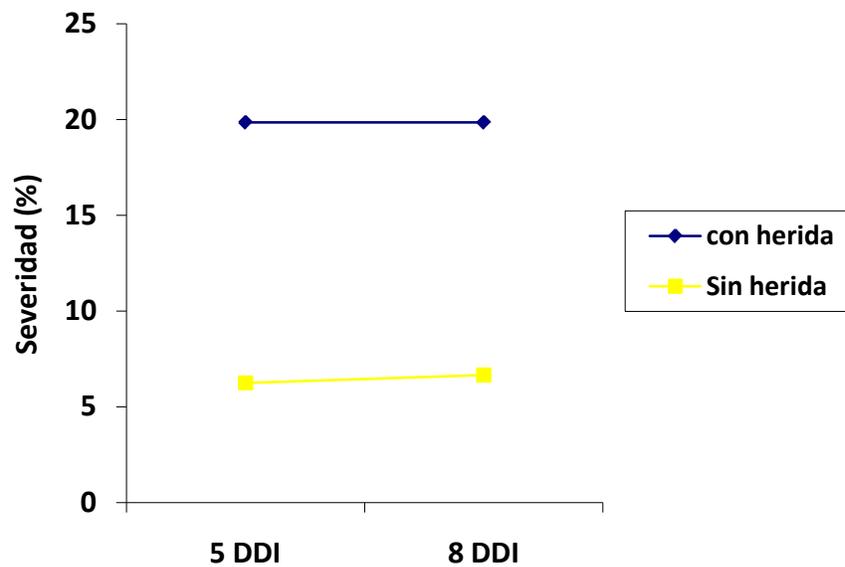
*Albonectria rigidiuscula* (229.II) y *Fusarium culmorum* (245.VII) resultaron patogénicos en las inflorescencias de longán solamente en los tratamientos con herida. Los síntomas de marchitez y necrosis de florecillas a lo largo del raquis se observaron a los ocho días después de inoculación. *A. rigidiuscula* y *F. culmorum* mostraron una severidad del 40 y 50% respectivamente (Fig. 69).



**Figura 69.** Marchitez de la raquilla y necrosis de las florecillas a los 8 días después de la inoculación causadas por (A) *Albonectria rigidiuscula* (229.II) y (B) *Fusarium culmorum* (245.VI).

*Pestalotiopsis clavispora* (236.V) fue patogénico en las inflorescencias de longán en los tratamientos con y sin herida. Resultando en una mayor severidad promedio en el tratamiento con herida (19.85%) en comparación al tratamiento sin herida (6.25%) (Fig.

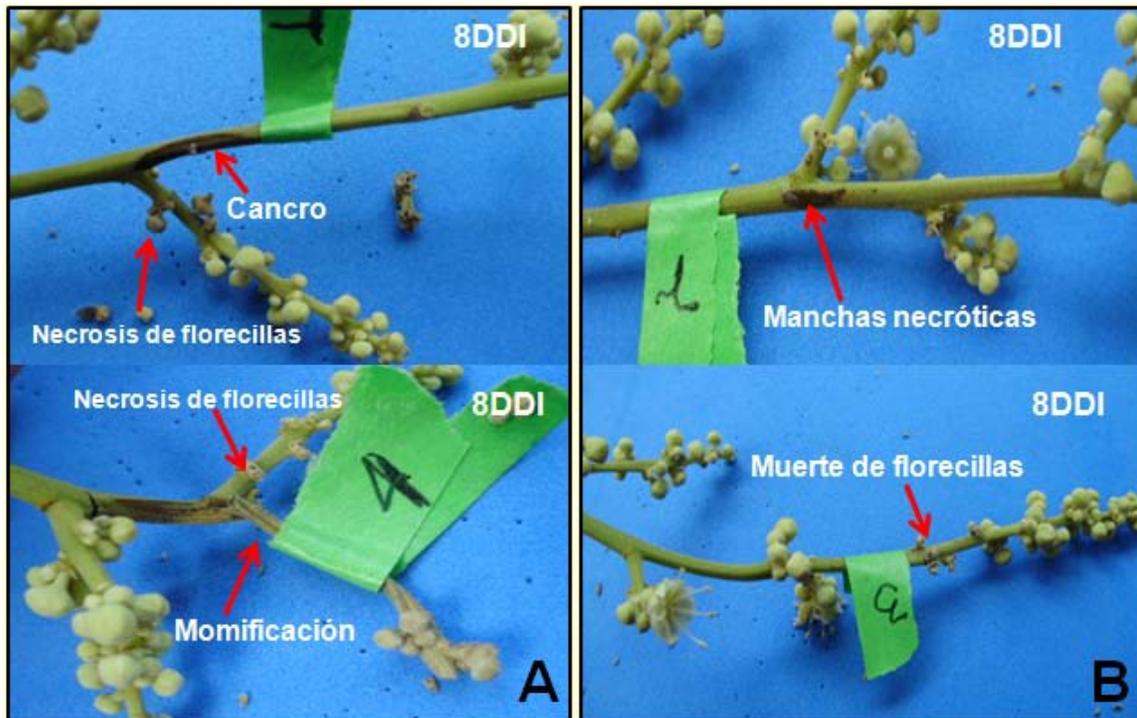
70)



**Figura 70.** Promedio del porcentaje de severidad de *Pestalotiopsis clavispora* (236.V) en tratamientos con y sin herida.

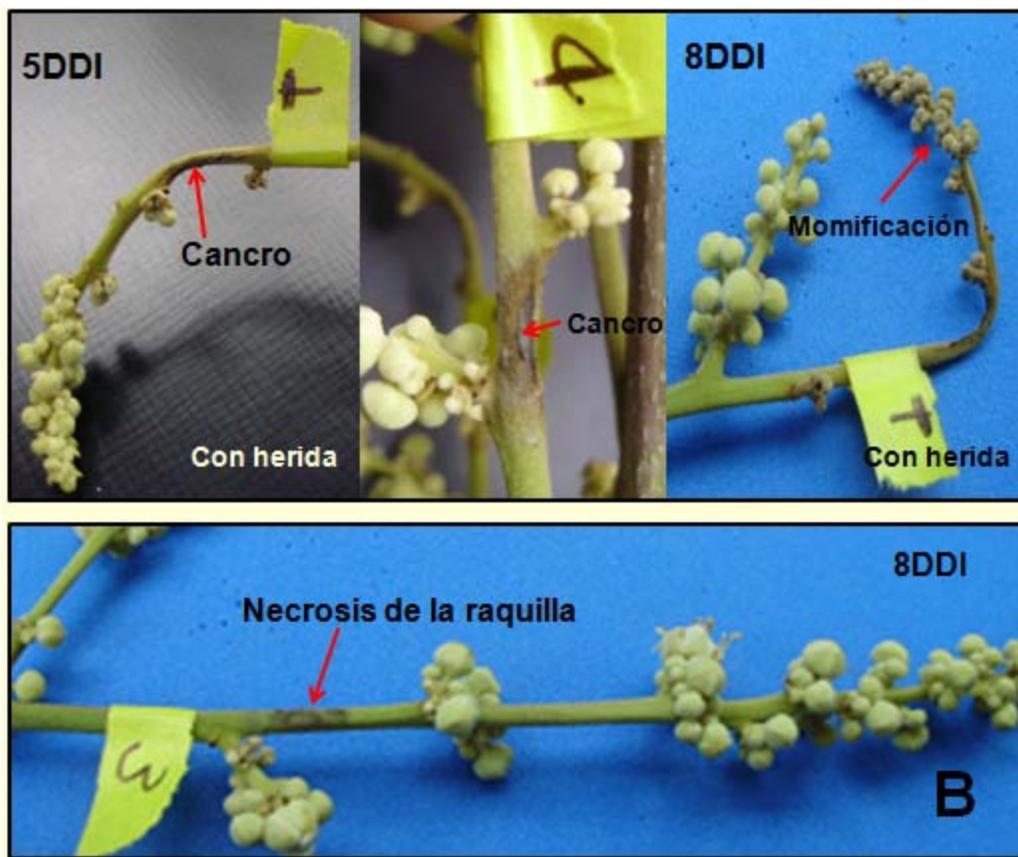
*Pestalotiopsis clavispora* produjo cuatro tipos de síntomas en la inflorescencia de longán: cancro, necrosis de las florecillas, manchas necróticas irregulares y quemazón. A los ocho días después de la inoculación, se observó cancro y necrosis de las florecillas en el raquis (eje central) y quemazón en la raquilla en los tratamientos con herida (Fig. 71 A).

Los tratamientos sin herida, ocho días después de la inoculación *P. clavispora* produjo en el raquis manchas necróticas irregulares de color marrón sobre el punto de inoculación y necrosis sobre las florecillas (Fig. 71 B).



**Figura 71.** Cancro, necrosis de florecillas, manchas necróticas y momificación de la raquilla causada por *Pestalotiopsis clavispora* (236.V) a los 8 días después de la inoculación. (A) Tratamientos con heridas y (B) tratamientos sin herida.

*Phoma* spp. (236.I) resultó patogénico en las inflorescencias de longán en los tratamientos con y sin herida (Cuadro 8). Se observó cancro y momificación de la raquilla en el punto de inoculación a los cinco y ocho días respectivamente en los tratamientos con herida. A los ocho días después de la inoculación, *Phoma* spp. produjo necrosis en la raquilla sobre el punto de inoculación del tratamiento sin herida (Fig. 72 A y B).

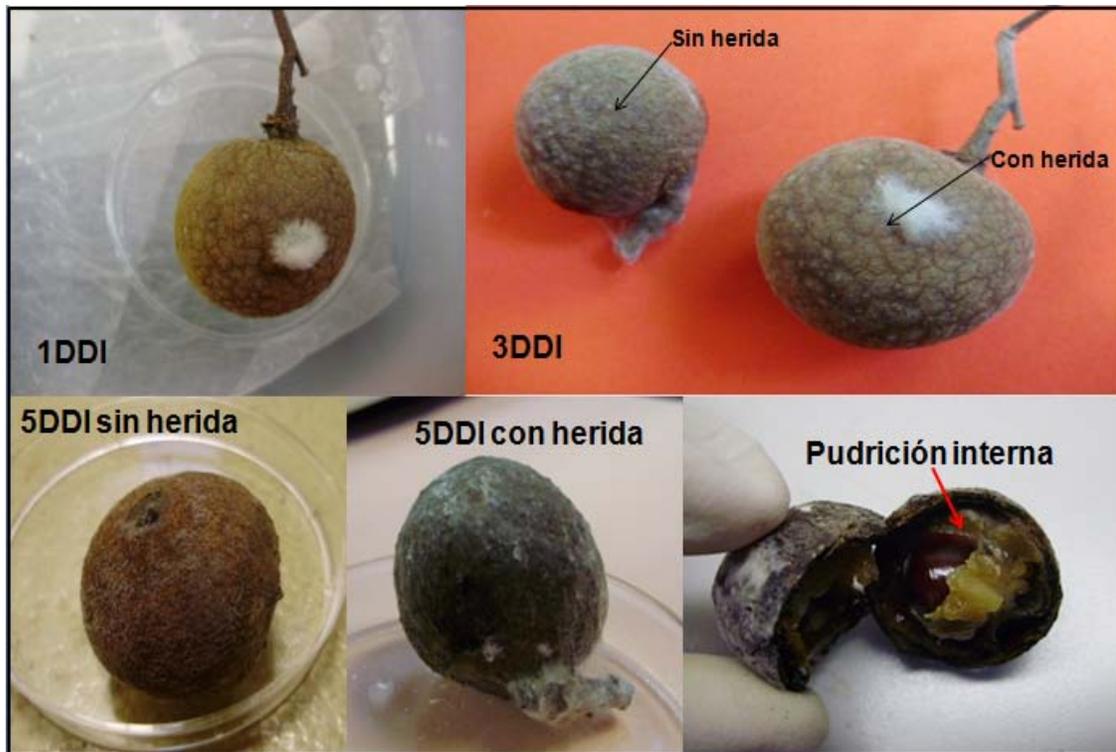


**Figura 72.** Cancro, momificación y necrosis de la raquilla causado por *Phoma* spp. (236.I) en inflorescencias de longán a los 5 y 8 días después de la inoculación. (A) Tratamientos con herida y (B) tratamientos sin herida

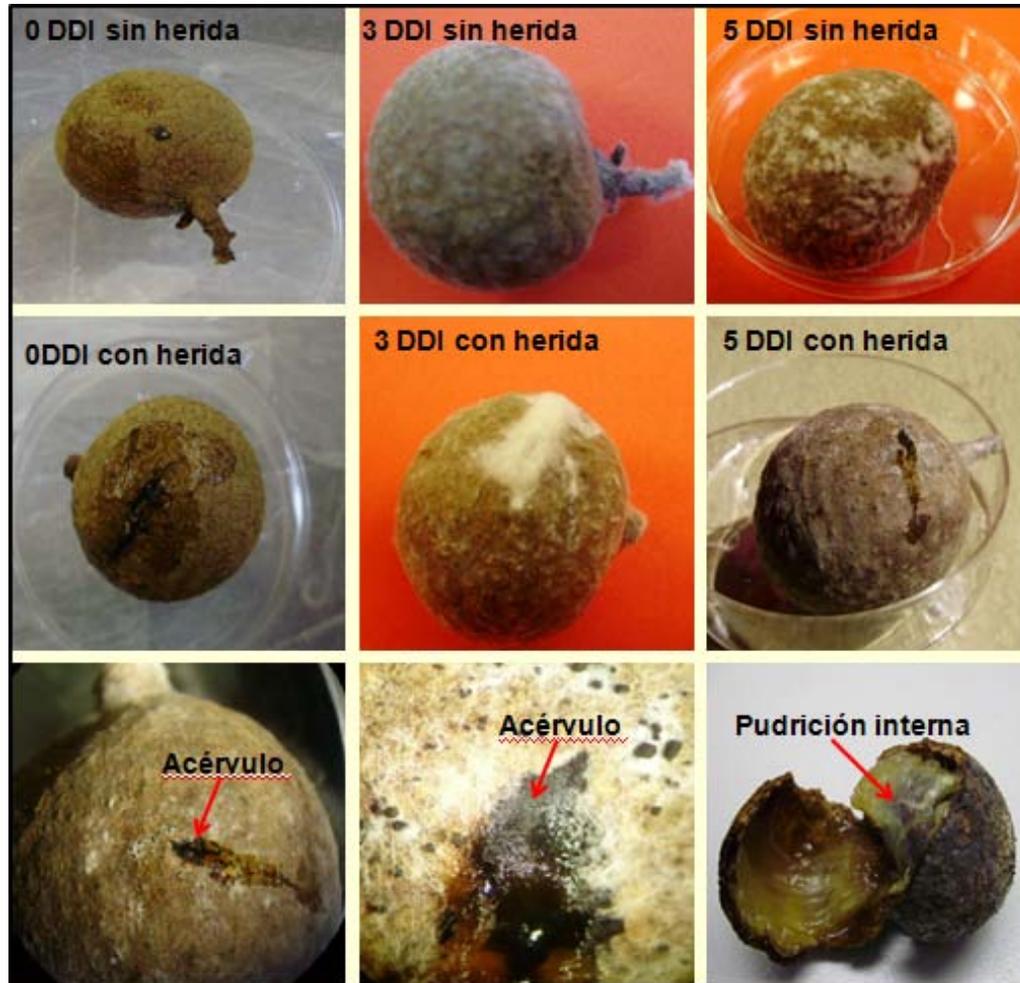
### 5.2.3.2.2 Frutos

De los tres aislados de hongos evaluados sólo *B. rhodina* y *P. clavispora* resultaron virulentos, colonizando el 100% de la fruta a los tres días después de la inoculación. *Phomopsis liquidambari* no fue patogénico a frutas de longán.

Se observó crecimiento micelial blanco sobre el punto de inoculación con *B. rhodina* y *P. clavispora* a partir del primer día después de la inoculación. A los tres días, el micelio cubrió totalmente la fruta y a los cinco días se observaron los picnidios de *B. rhodina* y los acérvulos de *P. clavispora* sobre el tejido vegetal. Se observó pudrición interna en la pulpa del fruto en las dos especies evaluadas (Figs. 73 y 74).



**Figura 73.** Pudrición interna del fruto de longán causada por *Botryosphaeria rhodina* (81.I) a los 3 y 5 días después de la inoculación en tratamientos con y sin herida.



**Figura 74.** Pudrición interna del fruto de longán causado por *Pestalotiopsis clavispora* (236.V) a los 3 y 5 días después de la inoculación en tratamientos con y sin herida. Se observa acérvulos sobre el tejido de la fruta.

## 6. DISCUSIÓN

Se obtuvieron 765 aislados de hongos asociados a frutales exóticos tropicales rambután y longán en las ocho localidades muestreadas en Puerto Rico. La mayoría de hongos fueron aislados de rambután (75.16%) en comparación al longán (24.83%). Ésto se debe a que hay más disponibilidad del cultivo de rambután en Puerto Rico y no existen fincas comerciales de longán. Además, la disponibilidad del inóculo inicial en los árboles de longán es menor en comparación con los árboles de rambután al no encontrarse monocultivos en Puerto Rico.

Se identificaron 27 géneros de hongos de los cuales 17 pertenecen al Filum Ascomycota y 10 son hongos mitospóricos donde solo se conoce su fase asexual. El 80% de los aislados fueron caracterizados morfológicamente. La mayoría de los aislados produjeron estructuras reproductivas en los diferentes medios de cultivo permitiendo la correcta identificación morfológica. El 20% de los aislados, fueron confirmados mediante caracterización molecular a través de la amplificación de la región ITS del rDNA, la utilización de los primers (CAMEL – CITRIC1) para la identificación de *Guignardia* spp. y CgInt / ITS4 para *C. gloeosporioides*. Aunque, la especie *Guignardia mangiferae* no fue patogénica a hojas de rambután, ha sido reportada como endófita en hojas de otros frutales tropicales (Baayen *et al.*, 2002; Ploetz, 2003). La identificación morfológica y confirmación molecular de esta especie mediante el uso de estos cebadores “primers” específicos fue de vital importancia para diferenciarla de la especie *Guignardia citricarpa*. Esta última se encuentra catalogada como un patógeno de medida cuarentenaria por la Sociedad Americana de Fitopatología (APS) (Madden, 2001).

Sin embargo, se han utilizado otros genes como el factor de alargamiento (elongation factor EF $\alpha$ 1) para la identificación más efectiva de las especies de *Fusarium* que el uso de la región ITS del rDNA (Ploetz, 2003, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2005 <http://isolate.fusariumdb.org/index.php>). Es por lo antes expuesto que se recomienda en estudios futuros utilizar este gen en conjunto con la caracterización morfológica, para identificar las especies de *Fusarium* asociadas a frutales exóticos tropicales.

De los 27 géneros encontrados 9 géneros fueron patogénicos a ambos frutales exóticos. Aunque, *Dolabra nepheliae* presentó el 100% de incidencia de enfermedad en los lotes evaluados afectando los tallos de rambután, no se pudieron completar los postulados de Koch con esta especie. El hongo no produjo estructuras reproductivas en medio de cultivo que permitiera la identificación a nivel morfológico. Éstos datos concuerdan con los reportados en la Florida, donde la especie se ha encontrado afectando tallos de lichi y no se ha podido aislar *D. nepheliae* en medio de cultivo (Palmateer, com. pers. 2010). A nivel molecular no existen secuencias homólogas de este hongo que permitan compararlos con la base de datos del GenBank.

Las especies *A. rigidiuscula* y *Phoma* spp. fueron patógenos a inflorescencias de rambután y longán presentando sintomatologías similares en ambos frutales exóticos tropicales. *Botryosphaeria rhodina*, *C. pseudospathiphylli*, *F. chlamydosporum*, *G. cingulata*, *Lasmenia* sp., *L. clusiae*, *P. virgatula*, *P. longicolla* resultaron patogénicos a inflorescencias y frutos de rambután. *B. rhodina*, *F. culmorum* y *P. clavispora*, fueron patógenos de inflorescencias y frutos de longán. Estos datos concuerdan con los reportados en Estados Unidos y Sur Este Asiático (Sivakumar, 1997; Sivakumar, 1999;

Sangchote, 1998; Sardud *et al.*, 1998; Nishijima, 2001; Ploetz, 2003; Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2005 y Rossman *et al.*, 2007).

En Puerto Rico, la necrosis de la fruta de rambután se encuentra asociada a las especies *B. rhodina*, *C. pseudospathiphylli*, *G. cigulata*, *F. chlamydosporum*, *Lasmenia* sp., *L. clusiae*, *P. virgatula* y *P. longicolla*. Las especies más virulentas fueron *B. rhodina*, *C. pseudospathiphylli*, *Lasmenia* sp. y *L. clusiae* las cuales en un período de 8 días cubrieron totalmente la fruta. Las especies *B. rhodina*, *G. cigulata*, *Lasmenia* sp., *L. clusiae*, *P. virgatula* y *P. longicolla* han sido reportadas previamente causando necrosis de la fruta de rambután en diferentes países asiáticos y de América (Sivakumar, 1997; Sivakumar, 1999; Sangchote, 1998; Nishijima, 2001; Ploetz, 2003; Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2005 y Keith, 2008).

Aunque la frecuencia de los aislados de *B. rhodina* es de 6.11%, esta especie fue muy virulenta afectando todos los órganos de la planta evaluados del rambután y longán. Los aislados evaluados infectaron hojas, inflorescencias y frutos de rambután e inflorescencias y frutos de longán. La sintomatología causada por *B. rhodina* en inflorescencias y frutos de los dos frutales exóticos evaluados es similar. En las inflorescencias se observó producción de micelio aéreo grisáceo sobre el tejido vegetal y quemazón de la raquilla. En hojas de rambután *B. rhodina* causó manchas necróticas con producción de picnidios sobre el tejido vegetal. La inducción de herida fue un factor determinante en la severidad de esta especie, observándose mayor daño en los tejidos que recibieron tratamientos con herida. Es por esta razón, que el manejo adecuado en huertos para el control de insectos que ocasionan un daño mecánico a la fruta, el manejo post cosecha de la fruta en la manipulación y el empaque adecuado son necesarios para evitar

lesiones en el tejido vegetal y de vital importancia para reducir la infección con *B. rhodina* (Ploetz, 2003).

Los aislados de *C. pseudospathiphylli*, fueron altamente virulentos a las frutas de rambután en tratamientos con y sin herida. La especie cubrió totalmente la fruta en un término de ocho días, observándose los conidióforos de su anamorfo sobre el pelo del rambután. Este es el primer reporte de esta especie en rambután, sin embargo, se ha encontrado asociado a eucalipto, *Eucalyptus* spp. y pino *Pinus*, spp. en Australia, el Sur Este Asiático y Estados Unidos (Lombard *et al.*, 2009; Lombard *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que estos aislados de TARS Mayagüez fueron encontrados en árboles de rambután ubicados al lado de árboles forestales provenientes de estas regiones geográficas, se especula éstos pudieron servir como fuente de inóculo y que el hongo pudo encontrar las condiciones favorables para su desarrollo y patogenicidad en este frutal exótico.

*Fusarium chlamydosporum* y *F. culmorum* resultaron patogénicos a las frutas de rambután e inflorescencias de longán, respectivamente, en tratamientos con herida solamente. Se observó necrosis de las frutas de rambután y momificación en inflorescencias de longán. *Albonectria rigidiuscula* en su estado anamorfo *F. decemcellulare*, fue patogénico a las inflorescencias de ambos frutales exóticos. Esta especie colonizó el tejido vegetal causando marchitez vascular, aborto y necrosis de las inflorescencias en los tratamientos con y sin herida. La presencia de herida fue un factor importante en la patogenicidad del hongo, ya que se observó mayor severidad para ambos frutales exóticos. Aunque *Fusarium* spp. es un patógeno que requiere heridas para infectar el tejido vegetal, *A. rigidiuscula* causó marchitez vascular en tratamientos sin

herida debido a que se inoculó directamente sobre las florecillas. Se asume que pudo penetrar por las aberturas naturales de los pistilos y las anteras de las florecillas de las inflorescencias (Agrios, 2005). Ésta especie ha sido reportada en lichi y mango causando corteza craqueada o “Corky bark” en el sur de la Florida. En lichi, este síntoma se encuentra asociado a las heridas causadas por las escamas, *Andaspis punicae* y se cree que este insecto es un vector del hongo (Ploetz, 2003). Especies de *Fusarium* han sido reportadas en el Sureste Asiático y Estados Unidos afectando inflorescencias de longán y frutos de ambos frutales exóticos. Las lesiones en el tejido vegetal ocasionadas por la presencia de insectos en estos frutales tropicales es un factor determinante en la entrada y patogenicidad de *Fusarium* spp. (Sardsud *et al.*, 1998; Ploetz, 2003).

*Glomerella cingulata* en su estado anamorfo *C. gloeosporioides* resultó patogénico a frutas de rambután. Se observó necrosis en las frutas de rambután en tratamientos con y sin herida. En el punto de la incisión *C. gloeosporioides* produjo acérvulos sobre la fruta de rambután. Se observó pudrición interna de la pulpa y presencia de exudados por la maceración del tejido vegetal. La presencia de herida no fue un factor determinante en la patogenicidad del hongo, puesto que la conidia de *C. gloeosporioides* puede penetrar el tejido vegetal con o sin heridas. La conidia se adhiere a la superficie del hospedero mediante la formación del apresorio. Luego se establece una infección inicial con la formación de una hifa intracelular que se ramifica dentro de las células vegetales. La muerte de las células ocurre debido a la producción de enzimas como quitinasas y  $\beta$ -1,3 glucanos (Prusky *et al.*, 2000; Timmer *et al.*, 2005; Diéguez *et al.*, 2005). Estos datos concuerdan con los reportados en Tailandia y Estados Unidos

donde el hongo causa pudrición de la fruta del rambután en pre y post – cosecha (Sivakumar, 1997; Sivakumar, 1999; Sangchote, 1998; Ploetz, 2003).

*Lasmenia* sp., fue uno de los hongos más frecuentemente aislado (14.64%) y virulentos al rambután. Se aisló de hojas, inflorescencias y frutos de rambután siendo patogénico en tratamientos con y sin herida. Las sintomatologías observadas fueron manchas necróticas con halo clorótico en las hojas, necrosis de las inflorescencias y frutos con abundante producción de los acérvulos sobre el pelo del rambután. Estos resultados concuerdan con los reportados en Hawaii, donde se ha observado este hongo atacando frutos de rambután en post cosecha (Nishijima *et al*, 2001). Sin embargo, en Malasia (lugar de origen de este frutal exótico), *Lasmenia* sp. no ha sido asociado como patógeno. Los materiales vegetales establecidos en Puerto Rico provenienen de Hawaii y Malasia y se podría especular que este hongo haya sido introducido desde el lugar de importación. Las esporas de este hongo pudieron haber sido diseminadas por el viento, agua entre otros factores, infectando al rambután o quedándose latentes en los tejidos vegetales. Una vez introducidos estos materiales en Puerto Rico, se establecieron las condiciones óptimas para su desarrollo y patogenicidad.

*Leuconectria clusiae* en su estado anamorfo *Gliocephalotrichum bulbilium* fue altamente virulento a las frutas de rambután cubriendo totalmente la fruta con un micelio blancuzco en un período de ocho días. *L. clusiae* ha sido reportado en Hawaii y Malasia como uno de los principales problemas en post cosecha causando el 30% de pérdidas en frutas de rambután en asociación de especies de las siguientes especies: *B. rhodina*, *C. gloeosporioides*, *P. virgatula* y *Phomopsis* spp. (Sivakumar, 1997; Sivakumar, 1999;

Sangchote, 1998; Nishijima, 2001; Ploetz, 2003; Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, 2005)

Un 3% de los aislados de *Phoma* spp. resultaron patogénicos a las inflorescencias de rambután y longán. La identificación de las especies a nivel morfológico y molecular no fue exitosa. La ausencia de estructuras reproductivas de algunos aislados y la similitud en forma y tamaño de las conidias de los aislados que produjeron estructuras reproductivas, no permitió la identificación de las especies a nivel morfológico. A nivel molecular, se identificaron 5 especies: *Phoma glomerata*, *Phoma herbarum*, *Phoma tracheiphila*, *Phyllosticta citrulina* y *Phoma putaminum*. Sin embargo, el porcentaje de similitud en el GenBank fue parecido (98 a 99%) para los aislados evaluados. Indicando esto que la amplificación de la región ITS de ADNr no permitió la distinción entre las especies de *Phoma*. Por lo anteriormente expuesto, algunos investigadores utilizan otros genes y banco de genes para la identificación de especies de hongos a nivel molecular (Rossman y Palm-Hernandez, 2008). Por ejemplo: la utilización del gen del factor de alargamiento (Elongation Factor  $\alpha 1$ ) y banco de genes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (<http://isolate.fusariumdb.org/index.php>) para la identificación de las especies de *Fusarium*. Los genes mitocondriales de la oxidasa del citocromo I y II (COX I y COX II) para la identificación de *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. La utilización del gen de  $\beta$  tubulina, el cual se encarga de la construcción de los microtúbulos, flagelos y formación del huso cromático durante la mitosis. Este gen se utiliza para la reconstrucción de relaciones filogenéticas entre especies *Botryosphaeria* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Gliocephalotrichum* spp., *Aspergillus* spp.,

*Trichoderma* spp. (Luck *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1998, Martin y Tolley, 2003; Slippers *et al.*, 2004 y 2005, Decock *et al.*, 2006 y Villa *et al.*, 2006)

*Phoma* spp. produjo pudriciones blandas, cancro, momificación y necrosis de los tejidos inoculados en ambos frutales exóticos tropicales en tratamientos con y sin herida. La herida no fue un factor determinante en la patogenicidad del hongo. *Phoma* spp. logró infectar las inflorescencias de rambután y longán evaluados en ambos tratamientos. Las conidias pueden penetrar el hospedero con o sin la formación de apresorios por heridas, aberturas naturales (estomas) o por penetración directa al tejido vegetal. Sin embargo, en especies de *Phoma* spp. existe la producción de sustancias mucilaginosas que cubren las hifas y las conidias (polisacáridos, glucoproteínas, polímeros de hexosaminas y xilanos) que aseguran el contacto con el hospedero y la degradación de la pared celular para la penetración de la especie a los tejidos de la planta. Otro mecanismo de penetración es el rompimiento de la cutícula cerosa de la planta por presión mecánica al tejido vegetal observada en las especies *P. macdonaldii*, *P. lingua* y *P. exigua* var. *linicola* (Hammond *et al.*, 1985; Decognet, 1994; Kerchung y Hoch, 1995; Saniewska y Diki, 1997; Roustae *et al.*, 2000). *Phoma* spp. han sido reportadas en Tailandia causando necrosis en frutas de rambután en post – cosecha (Sivakumar, 1997; Sivakumar, 1999; Sangchote, 1998).

*Phomopsis* spp., fue el género más frecuentemente aislado (21%). Molecularmente se caracterizaron las especies: *P. longicolla* y *P. liquidambari*. *P. longicolla* se aisló de tejido sintomático de hojas, inflorescencias y frutas de rambután y fue patogénico a frutas pero no a hojas ni a inflorescencias. Estos datos concuerdan con los reportados en el Sureste Asiático donde *Phomopsis* sp. es un patógeno que causa necrosis en frutas de rambután (Sivakumar, 1997; Sivakumar, 1999; Sangchote, 1998). *P.*

*liquidambari* se aisló de tejido sintomático y asintomático, de inflorescencias y frutos de longán pero los aislados evaluados no fueron patogénicos al tejido vegetal de longán. El hongo se encontró actuando como endófito en hojas de longán. Estos datos concuerdan con los reportados en la India, donde *P. liquidambari* se ha reportado como endófito en Teca, *Tectona grandis* L. (Murali *et al.*, 2006).

Un 16.38% de los aislados obtenidos corresponde a *Pestalotiopsis* spp. Caracterizándose a nivel morfológico y molecular las especies: *P. virgatula* y *P. clavispora*. *P. virgatula* se aisló de tejido vegetal sintomático y asintomático de rambután y ha sido reportado en Hawaii causando necrosis de las frutas de rambután (Keith, 2008). En Puerto Rico, el hongo fue patogénico a hojas causando manchas circulares e irregulares necróticas con halo clorótico sobre hojas de rambután y necrosis de las frutas. *P. clavispora* afecta a inflorescencias y frutos de longán. En las inflorescencias de este frutal exótico se observaron manchas necróticas en tratamientos sin herida y canchros, necrosis de florecillas y momificación del tejido vegetal en tratamientos con herida. En el fruto, el hongo produce necrosis y pudrición interna de la pulpa. Estos datos concuerdan con los reportados en Tailandia (Sardsud *et al.*, 1998).

Aunque no se realizaron pruebas de patogenicidad de los hongos *T. variabile* y *T. porosporiferum*, estas dos especies se encontraron asociadas a frutas de longán causando fumagina, datos que concuerdan con los reportes de Lim y Khoo (1987) donde el género *Triposphermum* se encontró asociado a la fumagina en hojas y frutos de mango.

Las especies *C. pseudospathiphylli*, *Lasmenia* sp. y *L. clusiae* son primeros reportes para Puerto Rico.

Los resultados obtenidos en esta investigación ofrecerá una herramienta útil a los agricultores de la isla y a nivel mundial en la identificación adecuada de las enfermedades que afectan al rambután, *N. lappaceum* y longán, *D. longan*. Esta información es indispensable para el control de las mismas. También, ofrecerá una información vital a la comunidad científica responsable del estudio e identificación de los patógenos de frutales exóticos tropicales, debido a la poca información disponible para el hemisferio occidental.

Estos cultivos representan un nicho económico que ha sido pobremente explotado en la isla. Los fruticultores de Puerto Rico podrían adoptar estos cultivos dadas las óptimas condiciones climáticas y geográficas para los mismos, además, de las grandes ganancias que generan (0.23 millones de dólares) (Crane *et al.*, 2005). La información recolectada en esta tesis es importante para desarrollar medidas de cuarentena en caso de que exista la necesidad de importar plántulas o semillas.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ 765 aislados de hongos fueron obtenidos de frutales tropicales exóticos rambután *N. lappaceum* L. y longán *D. longan* L. en Puerto Rico.
- ❖ El 75% de los aislados de hongos provienen de rambután y el 25% de longán, de las ocho localidades muestreadas alrededor de la isla.
- ❖ El 100% de los hongos asociados a frutales exóticos fueron identificados morfológicamente y el 20% fueron confirmados molecularmente mediante la amplificación de la región ITS del rDNA.
- ❖ Se identificaron 27 géneros de hongos de los cuales 17 pertenecen al Filum Ascomycota y 10 son hongos mitospóricos.
- ❖ *Phomopsis* spp. fue el género más frecuente, encontrado en hojas, inflorescencias y frutos de rambután y longán. Fue virulento a frutos de rambután, pero en este estudio no fue patogénico a hojas ni a las inflorescencias.
- ❖ *Lasmenia* sp. fue el segundo género más frecuente, el cual fue altamente virulento causando necrosis a frutas, inflorescencias y hojas de rambután.
- ❖ El tercer género más frecuente fue *Pestalotiopsis* spp., encontrado en hojas, inflorescencias, corteza y frutos de rambután y longán, fue virulento a frutas y hojas de rambután y frutas e inflorescencias de longán.
- ❖ *Fusarium* spp. encontrado en inflorescencias de rambután y longán y frutos de rambután, resultó virulento a inflorescencias de longán y frutos de rambután cuando había lesiones en el tejido vegetal.

- ❖ *Albonectria rigidiuscula* fue patogénico a las inflorescencias de ambos frutales exóticos. Esta especie colonizó el tejido vegetal causando marchitez vascular, aborto y necrosis de las inflorescencias en los tratamientos con y sin herida.
- ❖ Aunque son muy pocos los aislados *L. clusiae* y *C. pseudospathiphylli* son altamente virulentos al rambután, ya que cubren totalmente la fruta en un término de 8 días.
- ❖ *Botryosphaeria rhodina* causa pudrición en frutos de rambután en un término de ocho días y en longán en un término de 3 días. En las inflorescencias causa quemazón y en las hojas manchas necróticas.
- ❖ *Glomerella cingulata* en su estado anamorfo *C. gloeosporioides* resultó patogénico causando necrosis en la fruta de rambután en tratamientos con y sin herida.
- ❖ Los hongos *Tripospermum variabile* y *T. porosporiferum* causan fumagina sobre los frutos de longán afectando su comercialización.
- ❖ Aunque la especie *Guignardia mangiferae* no fue patogénica a hojas de rambután, la identificación morfológica y confirmación molecular de esta especie fue de vital importancia para diferenciarla de la especie *Guignardia citricarpa*. Esta última se encuentra catalogada como un patógeno de medida cuarentenaria por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.
- ❖ Las especies *L. clusiae*, *C. pseudospathiphylli* y *Lasmenia* sp. son primeros reportes para Puerto Rico.

## 8. RECOMENDACIONES

- Caracterizar molecularmente las especies de *Fusarium* con el gen del factor de alargamiento (Elongation Factor) y compararlas con la identificación de las especies realizada mediante amplificación de la región ITS del rDNA en este estudio.
- Caracterizar molecularmente las especies de *Botryosphaeria* con el gen de  $\beta$  tubulina y compararlas con la identificación de las especies realizada mediante amplificación de la región ITS del rDNA en este estudio.
- Identificar las especies de *Phoma* asociadas a frutales exóticos tropicales rambután, *N. lappaceum* y longán, *D. longan* en Puerto Rico.
- Confirmar morfológica y molecularmente las especies de *Phomopsis* spp., especialmente *P. longicolla* mediante la identificación a través de expertos y la utilización de “primers” específicos PL3.
- Comprobar la patogenicidad de *Dolabra nepheliae*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Afanador-Kafuri, L., D. Minz, M. Maymon, y S. Freeman. 2002. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Journal Phytopathology*. 93(5): 579-587.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York. USA 922 pp.
- Alexopoulos C.J., C.W. Mims y M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*, 4<sup>ed</sup>. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA 550 pp.
- Anónimo. 2003. *Agricultural science and resource management in the tropics and subtropics (Arts)*. Fruit and industry crops. Bonn Germany. 1–79 pp.
- Atkins, S. D. y I. M. Clark. 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*. 45(1): 3-15.
- Baayen, R.P., P.J.M. Bonants, G. Verkley, G.C. Carrol, AM. Van der, I.R. Weerd, G. C. Van Brouwershaven, W. Schutte, Jr. Maccheroni, C. Glienke de Blanco, y J. L. Azevedo. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Ecology and Population Biology*. 92 (5): 464–477
- Bailey, J.A. y M.J. Jeger. 1992. *Colletotrichum*. Biology, pathology and control. Redwood Press. London. 388 pp.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. APS Press, St Paul, Minnesota, USA. 218 pp.
- Booth, B.C., y W.P. Ting. 1964. *Dolabra nepheliae* gen.nov., sp.nov., associated with canker of *Nephelium lappaceum*. *British Mycological Society*. 47(2): 235-237
- Bridge, P. P., D. K. Arora, C. A. Reddy y R. P. Elander. 2000. *Applications of PCR in Mycology*. Ed. CAB International. The UK. 152 pp.
- Brown, A.E., S. Sreenivasaprasad y L.W. Timmer. 1996. Molecular characterization of slow – growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Molecular Plant Pathology*. 86 (5): 523-527.
- Burgess, T.I., P.A. Barber, S. Mohali, G. Pegg, W. Beer y M.J. Wingfield. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia*. 98 (3): 423–435.

Burrell, M. 1993. Enzymes of molecular Biology. Humana Press Inc. Totowa. New Jersey. United States of America. 372 pp.

Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiology Clinical*. 22(5): 299-305.

Crane, J.H., C.F. Balerdi, y S. Sargent, 2004. El mamoncillo longán en la Florida. Universidad de la Florida. Gainesville. 1-9 pp.

Crane, J.H., F. Zee, G.S. Bender, B. Faber, B. Brunner, Chia, C.L. 2005. Commercial sapindaceous fruit production in USA in II International Symposium on Lychee, Longan, Rambutan and other Sapindaceae Plants. *ISHS Acta Horticulturae* 665 (1). (Abstract)

Crous, P.W., A.C. Alfenas, y M.J. Wingfield, 1993. *Calonectria scoparia* and *Calonectria morganii* sp. nov., and variation among isolates or their *Cylindrocladium* anamorphs. *Mycologia*. 97 (6): 701-708.

Crous, P.W., W. Gams, V. Stalpers, V. Robert, y G. Stegehuis. 2004. Mycobank: Fungal database nomenclature and species banks online taxonomic novelties submission. <http://www.mycobank.com/MycoTaxo.aspx> accesado febrero de 2010.

Crous, P.W., J.Z. Groenewald, J.M. Risede, P. Simoneau, y K.D. Hyde. 2006. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with clavate vesicles. *Studies in Mycology*. 55: 213–226.

Decock, C., S. Huret, y P. Charue, 2006. Anamorphic fungi from French Guyana: two undescribed *Gliocephalotrichum* species (Nectriaceae, Hypocreales). *Mycologia*. 98 (3): 488–498.

Decognet, V. 1994. *Phoma exigua* var. *linicola*, agent du mort-lin: Variabilité et mode d'infection du parasite, expression de la maladie. Ph.D. thesis, Université de Rennes, Rennes, France. 108 pp.

Denman, S., P.W. Crous, J.E. Taylor, J. Kang, I. Pascoe y M.J. Winfield. 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.

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). 2005. Pest lists for fresh *Litchi chinensis* (lychee or litchi), *Dimocarpus longan* (longan), *Mangifera indica* (mango), *Garcinia mangostana* L. (mangosteen), *Nephelium lappaceum* L. (rambutan), and *Ananas comosus* (pineapple) Fruit from Thailand. Plant Epidemiology and Risk Analysis Laboratory Center for Plant Health Science and Technology. Thailand. 136 pp.

Diéguez, U.J., H. Foster, E.A. Soto, y J.E. Adaskaveg. 2005. Subcuticular intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. *Phytopathology, Ecology and Epidemiology*, 95 (7): 751-758.

Donald, C.E, y O.K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. St Paul, Minnesota. USA. 223 pp.

Du, M., C.L. Schardl, E.M. Nuckles, y L.J. Villancourt. 2005. Using mating – type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complex. *Mycologia*. 97 (3): 641–658.

Dyko, B.J. y J.E.M. Mordeu. 1979. *Colletotrichum acutatum*. CMI (Commonw. Mycol. Ins) Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 630. 353 pp.

Edel, V., C. Steinberg, N. Gautheron, y C. Alabouvette. 1996. Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR) amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycologia*. 101 (2): 179–187.

Ellis, J.J., y C.W. Hesseltine. 1962. A new genus of moniliales having penicilli subtenden by sterile hairs. *Bulletin of the Torrey Botical Club*. 89 (1): 21-27.

Evans, E.A. y S. Nalampang. 2008. Importation of tropical fruits from Thailand. University of Florida, IFAS extension. 1-8 pp.

FAO, 2004. Producción de frutas y hortalizas y su proporción en la producción mundial. [http://www.fao.org/es/ess/yearbook/vol\\_1\\_1/pdf/b03.pdf](http://www.fao.org/es/ess/yearbook/vol_1_1/pdf/b03.pdf) accesado noviembre de 2008.

Farungsang, U. S. Sangchote y N. Farungsang. 1992. Appearance of quiescent fruit rot fungi on rambutan stored at 13°C and 25°C. *ISHS Acta Horticulturae* 321: Frontier in Tropical Fruit Research. Thailand. (Abstract)

Freeman, S. 2000. Genetics diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruit. En: *Colletotrichum* host specificity, Pathology, and host pathogen interaction, APS Press, St Paul. 131-144 pp.

Gallegly, M.E y C. Hong. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA Fingerprints. APS Press. St Paul, Minnesota, USA. 158 pp.

Glass, N.L. y G. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR amplify conserved genes for filamentous fungi. *Appl, Environm, Microbiol* 61: 1323-1330.

Godoy–Torres, G.C. y N. Reyes. 2007. Estudio del sector: Rambután. Programa interinstitucional integrado para la diversificación de exportaciones en Honduras (PIIDEH). 1–89 pp.

Guba, F. 1961. Monograph of Monochaetia and Pestalotia. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. USA. 315 pp.

Hammond, K. E., B. J. Lewis y T. M. Musa. 1985. A systemic pathway in the infection of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathology. 34: 557-565.

Hanlin, R.T. 1997. Illustrated genera of Ascomycetes. Vol 1. APS Press. St Paul Minnesota, USA. 263 pp.

Hibbett, D. S. 1992. Ribosomal RNA and fungal systematics. Transactions British Mycological Society. 33: 533-556.

Holliday, P. 1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. CUP Archive, USA. 624 pp.

Huang, L.H. y J.A. Schmitt. 1973. *Gliocephalotrichum ohioense*, a new species from Ohio soil. Mycologia. 65: 948-952.

Kang, J.C, P.W. Crous, y C.L. Schoch. 2001. Species concepts in the *Cylindrocladium floridanum* and *Cy. Spathiphylli* complex (*Hypocreaceae*) based on multi – allelic sequence data, sexual compatibility and morphology. Systematic and Applied Microbiology. 24: 206-217.

Keith, L.M. 2008. First report of *Pestalotiopsis virgatula* causing *Pestalotiopsis* fruit rot on rambutan in Hawaii. Plant Disease. 92 (5): 835.

Kerchung, K., y H. C. Hoch. 1995. Visualization of the extracellular matrix surrounding pycnidiospores, germlings and appressoria of *Phyllosticta amplicida*. Mycologia. 87: 759-771.

Konstantinova, P., P. J. M. Bonants, M. P.E. Van Gent-Pelzar, P. Van der Zouwen, y R. van den Bulk. 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* ssp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. Mycological Research. 106 (1): 23-33.

Leslie, J.F. y B.A. Summerell. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Backwell Publishing, Oxford, UK, 388 pp.

Lewin B, 2004. Genes VIII. Eighth Edition. Pearson Prentice Hall. New York. United State of America. 1024 pp.

Liew, E.C.Y., D.J. Maclean y J.A.G. Irwin. 1998. Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of ribosomal DNA. Mycologia. 102 (1): 73-80.

Lim, T.K y K.C. Khoo. 1987. Diseases and disorders of mango in Malaysia. Tropical Press SDN, BHD. Lumpur, Malaysia. 100 pp.

- Lombard, L., C.A. Rhodas, P.W. Crous, B.D. Wingfield, y M.J. Wingfield. 2009. *Calonectria* (*Cylindrocladium*) species associated with dying pinus cuttings. *Persoonia*. 23: 41-47.
- Lombard, L., X.D. Zhou, P.W. Crous, B.D. Wingfield y M.J. Wingfield. 2010. *Calonectria* species associated with cutting rot of *Eucalyptus*. *Persoonia*. 24: 1 -11.
- Luck, J.E., M.R. Gillings y C.C. Steel. 1994. Amplification and cloning of a  $\beta$ -tubulin gene fragment from strains of *Botrytis cinerea* resistant and sensitive to benzimidazole fungicides. *Horticultural Science*. 22 (2). (Abstract).
- Madden, L.V. 2001. What are the Nonindigenous Plant Pathogens that Threaten U.S. Crops and Forests? <http://www.apsnet.org/online/feature/exotic/> accesado marzo de 2010.
- Martin, F.N. y P.W. Tooley. 2003. Phylogenetic relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*. 95(2): 269–284.
- Marulanda, M., L. Isaza, y A. M. Ramirez. 2007. Identificación de la especie de *Colletotrichum* responsable de la antracnosis en la mora de castilla en la región cafetera. *Scientia et Technica*. (37): 580-590.
- Meyer, L., G.M. Sanders, R. Jacobs y L. Korsten. 2006. A One-day sensitive method to detect and distinguish between the citrus black spot pathogen *Guignardia citricarpa* and the endophyte *Guignardia mangiferae*. *Plant Disease*. 90 (1): 97-101.
- Morris, B.M., y N.A.R. Gow. 1993. Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. *Phytopathology*. 83: 877–882.
- Murali, T. S., T. S. Suryanarayanan, y R. Geeta. 2006. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. *Canadian Journal of Microbiology*. 52 (7): 673–680.
- Nishijima, K. A. y P. A. Follett. 2001. First report of *Lasmenia* sp. and two species of *Gliocephalotrichum* on rambutan in Hawaii. *Plant Disease*. 86 (1): 71.
- O'Donnell, K., E. Cigelnik y H. Nirenberg. 1998. Molecular systematic and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90(3): 465–493.
- Ploetz, R.C. 2003. Diseases of tropical fruit crops. CABI Publishing, Cambridge, 307-325 pp.
- Ploetz, R.C. 2007. Tropical fruit crops and the diseases that affect their production. International commission on tropical biology and natural resources. *Plant Disease*. 91(6): 664-663.

- Prusky, D., S. Freeman, y M.B. Dickman. 2000. *Colletotrichum*. Host specificity, pathology and host-pathogen interaction. APS Press. St. Paul, Minnesota. 393 pp.
- Rivera-Vargas, L., Y. Lugo-Noel, R. J. McGovern, T. Seijo y M. J. Davis. 2006. Occurrence and distribution of *Colletotrichum* spp. on Mango (*Mangifera indica* L.) in Puerto Rico and Florida, USA. *Plant Pathology*. 5(2): 191-198.
- Rivero, J.A. y B. Brunner. 2007. Árboles frutales exóticos y poco conocidos en Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico. 357 pp.
- Rossmann, A.Y., y G.J. Samuels. 1993. *Leuconectria clusiae* gen. nov. and its anamorph *Gliocephalotrichum bulbilium* with notes on *Pseudonectria*. *Mycologia*. 85(4): 685-704.
- Rossmann, A.Y., Samuels, G.J., Rogerson, C.T. y Lowen, R. 1999. Genera of *Bionectriaceae*, *Hipocreaeae* and *Nectriaceae* (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology*. 42: 1-248 pp.
- Rossmann, A.Y., R. Goenaga, y L. Keith. 2007. First Report of *Dolabra nepheliae* on Rambutan and Litchi in Hawaii and Puerto Rico. *Plant Disease*. 91(12): 1685.
- Rossmann, A.Y. y M.E. Palm-Hernández. 2008. Systematics of Plant Pathogenic Fungi: Why It Matters. *Plant Disease*. 92(10): 1376-1386.
- Roustae, A., G. Dechamp-Guillaume, B. Gelie, C. Savy, R. Dargent y G. Barrault. 2000. Ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma macdonaldii* in Sunflower seedlings. *Phytopathology*. 90 (8): 915-920.
- Santos-Flores, C.J. y C. Betancourt-López. 1987. Aquatic and water-borne hyphomycetes (Deuteromycotina) in streams of Puerto Rico. *Journal Caribbean Science*. (2): 115.
- Sangchote, S., U. Farungsang, y N. Farungsang. 1998. Pre- and Postharvest infection of rambutan by pathogens and effects of post harvest treatments. Australian center for International Agricultural Research. Cranberra. 87-91 pp.
- Saniewska, A. y B. Dyki. 1997. Development of *Phoma narcissi* within tissues of *Hippeastrum* leaves. *Phytopathology, Polonica*. 14: 55-60.
- Sardsud, V., C. Sttigul, U. Sarsud, P. Chantrasri y S. Promin. 1998. Endophytic fungi in longan. Australian Center for International Agricultural Research. Cranberra. 147-152.
- Screenivasaprasad, S., K. Sharada, A.E. Brown y P.R. Mills. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*. 45: 650-655.

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

Sivakumar, D., R.S.W. Wijeratnam, R.L.C. Wijesundera y M. Abeysekera. 1997. Post-harvest diseases of rambutan (*Nephelium lappaceum*) in the western Province. Journal of the National Council of Sri Lanka. (25): 225-229.

Sivakumar, D., Wijeratnam, R.S.W. y Wijesundera, R.L.C. y Abeysekera, M. 1999. Field sanitation and the occurrence of brown spots disease of rambutan (*Nephelium lappaceum*) fruits. Journal of the National council of Sri Lanka 27 (2): 93-97.

Slippers, B., P.W. Crous, S. Denman, T.A. Coutinho, B.D. Wingfield y M.J. Wingfield. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia. 96(1): 83-101.

Slippers, B., G.I. Johnson, P.W. Crous, T.A. Coutinho, B.D. Wingfield y M.J. Wingfield. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. Mycologia. 97(1): 99–110.

Stanley, F., T. Katan y E. Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Disease. 82(6): 596-605.

Suga, H., T. Hasegawa, H. Mitsui, K. Kageyama y M. Hyakumachi. 2000. Phylogenetic analysis of phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based on the rDNA-ITS region. Mycologia. 104(10): 1175–1183.

Sutton, B.C. 1980. The coelomycetes fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew. Surrey. England. 696 pp.

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Baley, J.A. and Jeger, M.J. (eds) *Colletotrichum – Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, pp. 1-26.

Timmer L.W., J.E. Adaskaveg, J.C. Correl. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease. 89(8): 784-796.

Van –West, P., B.M. Morris, B. Reid, A.A. Appiah, M.C. Osborne, T.A. Campbell, S.J. Shepherd, N.A.R. Gow. 2002. Oomycete plant pathogens use electric fields to target roots. Molecular Plant-Microbe Interactions. 15(8): 790–798.

Villa N.O., K. Kageyama, T. Asano, H. Suga. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ -tubulin gene sequences. Mycologia. 98(3): 410-422.

Von Arx, J. 1957. Die Arten der Gattung *Colletotrichum corda*. *Phytopathology*. 29: 413–468.

Wharton, S.P. y U.J. Diéguez. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anuales del Jardín Botánico de Madrid*. 61: 3-22.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, 315-322 pp.

Wiley, R.J. y E.G. Simmons. 1971. *Gliocephalotrichum*, new combinations and a new species. *Mycologia*. 63: 575-585.

Zalasky, H., A. Nawawi, W.P. Ting y L.H. Tai. 1971. *Dolabra nepheliae* and its imperfect state associated with canker of *Nephelium lappaceum* and *N. mutabile*. *Canadian Journal of Botany*. 49: 559-561.

Zee, F.T. 1993. Rambutan and pili nuts: Potential crops for Hawaii. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *New crops*. Wiley, New York. 461-465 pp.

Zhou, S. y G.R. Stanosz. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from analyses of ITS and 5.8 rDNA sequences. *Mycologia*. 93: 516-527.