



Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, GENOTÍPICA Y SECRETÓMICA DE *Lasiodiplodia* spp. PATOGÉNICAS EN FRUTOS DE PAPAYA EN MÉXICO

Por:

PAOLA ALEJANDRA PICOS MUÑOZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN CULIACÁN DEL CIAD EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA
PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

CULIACÁN, SINALOA

ENERO DE 2017

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de la M.C. PAOLA ALEJANDRA PICOS MUÑOZ, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



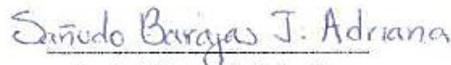
Dr. Raúl Allende Molar
Director de Tesis



Dr. Raymundo S. García Estrada
Asesor



Dra. Josefina León Félix
Asesor



Dra. J. Adriana Sañudo Barajas
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González

Director General

“No te conformes con el qué, sino que logra saber el porqué y el cómo”

Sir Robert Baden-Powell (1857 - 1941)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado y con ello, la oportunidad para concretar un posgrado, brindando a jóvenes, académicos e investigadores en formación a acceder a una capacitación de alta especialidad.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., en particular a la Coordinación Culiacán, por abrirme nuevamente sus puertas y formar parte de esta Institución.

Al proyecto “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” de SAGARPA por el financiamiento brindado para la realización de esta tesis de doctorado.

Al Dr. Raúl Allende Molar por darme la oportunidad de desarrollar esta investigación y por compartir sus conocimientos conmigo, por su tiempo y asesorías en las que no solo estaba formando un alumno sino también a un ser humano, con un sabor agridulce entre triunfos y derrotas todas llenas de un aprendizaje.

Al Dr. Raymundo Saúl García Estrada, por transmitirme su entusiasmo y perseverancia, por alentarme a seguir adelante, por sus muy atinados comentarios y sugerencias.

A la Dra. Josefina León Félix, por enseñarme que siempre hay una solución ante cualquier problema, por su disposición a brindar un consejo y compartir su conocimiento.

A la Dra. Adriana Sañudo Barajas por sus enseñanzas y sugerencias en el desarrollo de este trabajo y aún a pesar de la distancia temporal, el mostrar siempre estar dispuesta a colaborar.

A los técnicos del laboratorio de Fitopatología Ing. Isidro Márquez Zequera e Ing. Luis Osuna, del laboratorio de Biología Molecular y Genética QFB Héctor Carrillo por sus enseñanzas, sugerencias, colaboración y compañerismo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Fitopatología.

A todos los investigadores de CIAD que formaron parte de mi formación académica y profesional, en especial a la Dra. María Dolores Muy Rangel y Dr. Benigno Valdez, marcaron la diferencia entre mis seminarios de investigación.

A la L.B. María Magdalena Vallejo Sánchez por todo el apoyo en la obtención de artículos científicos, los cuales fueron de gran utilidad para la realización de este proyecto de investigación, por su asistencia técnica en la biblioteca y por brindarme su amistad.

A todos mis compañeros de generación en especial a Mercedes Verdugo y Anabel Altamirano, porque fuimos cómplices en esta aventura de la investigación y cumplimos con el objetivo de “Ser mujer, mamá y trabajadora”, sin el límite femenino impuesto por la sociedad rompiendo paradigmas y esquemas, demostrando el “Sí se puede”. A Isabel Cruz y Belia Contreras, por compartir los sagrados alimentos, las pato aventuras, los dimes y diretes de la vida, gracias muchachas.

DEDICATORIA

Al creador, por su infinita sabiduría y conocimiento, por escogerme para ponerla en práctica y compartirla.

A mi familia: mis padres Judith y Miguel, mi hermana Nathyeli, por su paciencia y comprensión. Sin ellos no estaría escrito este trabajo.

A mis abuelos que se adelantaron en el camino y no vieron concluido este capítulo de mi vida: Elsa Casanova (Mema) y Vicente Picos (papá Chente).

A mis tesoros Hefziba, Nahomi y Alonso, que aún no comprenden por qué he de pasar tantas horas delante del ordenador para hacer un trabajo, y ellos solo quieren jugar, gracias por ser buenos niños.

“Cuando quieras saber que tan llenas tienes tus manos, no veas lo que posees, mira lo que has dado” Anónimo

INDICE

APROBACIÓN.....	i
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
INDICE.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	25
General.....	25
Específicos.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	26
CAPÍTULO II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	27
Generalidades del Cultivo.....	27
Taxonomía y Clasificación.....	27
Descripción General de <i>Carica papaya</i> L.....	27
Variedades.....	28

Importancia del Cultivo de Papaya	29
Pérdidas Poscosecha de Frutos	30
Enfermedades del Cultivo de Papaya.....	30
Literatura Citada.....	32
CAPÍTULO IV. ARTÍCULO DE REVISIÓN	35
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control.....	35
Resumen	35
Abstract.....	36
Taxonomía.....	38
Biología.....	41
Reportes en México.....	46
Conclusiones	50
Agradecimientos	50
Literatura Citada	50
CAPÍTULO IV. ARTÍCULO CIENTÍFICO	64
Especies de <i>Lasiodiplodia</i> Causantes de Pudrición del Pedúnculo en Frutos de Papaya en México.....	64
<i>Lasiodiplodia</i> Species Causing Stem-End Rot on Papaya Fruits in Mexico	64
Resumen	64
Palabras Clave Adicionales	65
Abstract.....	65
Additional Keywords	65
Metodología.....	66
Resultados y Discusión	68

Conclusiones	70
Literatura Citada	71
CAPÍTULO V. ARTÍCULO CIENTÍFICO	79
Variabilidad Genética de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> Responsable de la Pudrición del Pedúnculo de Papaya en México.	79
Resumen	79
Palabras Clave	80
Introducción	80
Metodología	81
Resultados.....	83
Discusión	83
Agradecimientos	84
Literatura Citada	84
CAPÍTULO VI. ARTÍCULO CIENTÍFICO	90
Secretoma de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> Agente Causal de la Pudrición de Frutos en Papaya de México.....	90
Resumen	90
Palabras Clave Adicionales	91
Abstract.....	91
Materiales y Métodos.....	93
Resultados y Discusión	95
Conclusiones	97
Literatura citada	97
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES GENERALES	106
Especies Crípticas.....	106
Diversidad Genética	106

Virulencia.....	107
Secretoma.....	107

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Reportes en México de <i>L. theobromae</i> afectando distintos cultivos frutícolas y maderables.....	63
Cuadro 2. Aislados de <i>Lasiodiplodia</i> usados en este estudio.....	77
Cuadro 3. Oligonucleótidos SSR usados en este estudio.....	87
Cuadro 4. Concentración de proteínas de acuerdo al medio en que se cultivó a <i>L. theobromae</i>	102
Cuadro 5. Proteínas identificadas en SDS-PAGE.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general que muestra la planificación de la investigación.....	22
Figura 2. Estructuras de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> en aislado proveniente de papaya.....	62
Figura 3. Morfología de <i>Lasiodiplodia</i> en frutos de <i>Carica papaya</i>	74
Figura 4. Árbol consenso obtenido de las secuencias ITS/EF de <i>Lasiodiplodia</i>	75
Figura 5. Patogenicidad en frutos de <i>Carica papaya</i>	76
Figura 6. Amplificación de 13 aislados de <i>L. theobromae</i> usando los marcadores LAS5and6 (SSR).....	88
Figura 7. Dendrograma obtenido de los 25 aislados de <i>L. theobromae</i> usando marcadores SSR.....	89
Figura 8. SDS-PAGE del secretoma de <i>L. theobromae</i>	103
Figura 9. Zimograma de actividad extracelular de <i>L. theobromae</i>	105

RESUMEN

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* es el agente causal de la pudrición del pedúnculo y muerte de tallos en una gran variedad de hospedantes. En México *L. theobromae* está asociado con estas enfermedades en cultivos como mango, uva, papaya, rambután, zapote y cítricos, sin embargo reportes que combinen estudios fenotípicos y genotípicos son escasos. *L. theobromae* pertenece a un complejo de especies crípticas, es decir morfología similar pero diversas genéticamente. Es necesario determinar si *L. theobromae* es la única especie que ocasiona la pudrición del pedúnculo en el cultivo de papaya del país. Se conoce que las especies en el complejo *Lasiodiplodia* difieren en patogenicidad y virulencia, de ahí que sea necesario identificarlas, ya que además responden de manera distinta a los fungicidas utilizados en su control.

Los hongos fitopatógenos secretan proteínas que participan en el proceso de patogénesis y virulencia, sin embargo, en especies de *Lasiodiplodia* es escasa la información al respecto, por lo que conocer las enzimas secretadas por el hongo durante la infección, nos ayudará a comprender este proceso y así poder establecer mejores estrategias de prevención y control de *L. theobromae*.

Lasiodiplodia es un género de impacto y amplia distribución en cultivos de importancia económica. Es necesario conocer los aspectos de su variabilidad fenotípica y genotípica, así como su relación con zonas geográficas de México como medida de éxito en su manejo y control. En el presente trabajo se realizaron aislamientos a partir de frutos infectados por *Lasiodiplodia* spp. colectados en las principales zonas productoras de papaya en México. Se identificaron dos especies pertenecientes al complejo *Lasiodiplodia*: *Lasiodiplodia theobromae* y *L. pseudotheobromae* mediante técnicas morfológicas y moleculares. Se diferenciaron principalmente por el tamaño de los conidios y por estructuras internas de picnidios. Se confirmó la identidad mediante secuenciación de dos regiones del ADN, la región

transcripta interna (ITS1-5.8S-ITS2) y un fragmento del gen factor de elongación 1- α (EF- α) y posterior alineación en base de datos. En base a la zona geográfica de origen de las muestras estudiadas, se estableció una relación genética de dos zonas, la vertiente del Océano Pacífico y la del Golfo de México. En las dos zonas se encontró una diversidad genética media alta, lo que sugiere que no hay relación genética entre ellas, y esto podría deberse a las barreras geográficas existentes (la sierra madre del sur, sierra madre occidental). El análisis del secretoma de *L. theobromae* fue de mayor diversidad enzimática en proteasas, celulasas y pectinasas cuando se cultivó *in vitro* con paredes celulares inactivas de papaya que cuando se creció solo en medio de cultivo tradicional.

Palabras clave

Lasiodiplodia theobromae; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; filogenia, diversidad genética; secretoma.

ABSTRACT

The fungus *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of stem end rot and die back in a variety of hosts. In Mexico *L. theobromae* is associated with these diseases in crops like mango, grapes, papaya, rambutan, zapote and citrus, however reports that combine phenotypic and genotypic studies are still scarce. *L. theobromae* belongs to a complex of cryptic species, species whose morphology is very similar but genetically different. It is necessary to determine if *L. theobromae* is the only species that causes stem-end rot in papaya fruits in the country. It is known that each species belonging to this complex has different virulence and pathogenicity, then it is necessary to identify them because they respond differently to the fungicides used for controlling the disease.

Phytopathogenic fungi secrete enzymes that are involved in the pathogenesis process and virulence; however, in *Lasiodiplodia* spp this information is scarce; so knowing the secreted enzymes by the fungus during the infection, will help us to understand this process and be able to develop better strategies for prevention and control of diseases caused by *L. theobromae*.

Lasiodiplodia is a genus of impact and widespread distribution in crops of economic importance. It is necessary to know aspect of phenotypic and genotypic variability, as well as its relation with geographic areas of Mexico as a measure of success in its management and control. In the present work, isolates were made from fruits infected by *Lasiodiplodia* spp., collected in the main areas producing papaya in Mexico. Two species belonging to the complex of cryptic species of *Lasiodiplodia*: *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae* were identified by morphological and molecular techniques. They were characterized morphologically mainly by the size of the conidia and structures within pycnidia. Furthermore two DNA regions, the internal transcribed region (ITS1-5.8S-ITS2) and a fragment of the elongation factor 1 α (EF- α) gene were

also sequenced, and the sequences were aligned with strains from a database to confirm the identity.

Based on the geographical area of origin of the samples studied, it was possible to establish a genetic relationship of two areas, the Pacific Ocean and the Gulf of Mexico. In both regions a medium high genetic diversity was found, suggesting that there is not any genetic relationship between both areas, and this could be due to existing geographic barriers (the Sierra Madre del Sur and the Sierra Madre Occidental).

The secretome analysis of *L. theobromae* was differentially of greater enzymatic diversity of proteases, cellulases and pectinases when cultured *in vitro* with inactive cell walls of papaya than growing only in culture medium.

Keywords

Lasiodiplodia theobromae; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; phylogeny, genetic diversity; secretome.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es originaria de las zonas tropicales de México y Centro América. Este fruto por su alto valor nutritivo y propiedades medicinales posee características que han contribuido a incrementar su cultivo. La papaya se consume principalmente como fruta, además se usa para preparar jugos, encurtidos, mermelada, fruta en almíbar o cristalizada. También produce látex que se extrae de los frutos verdes y tallo, el cual contiene una enzima que favorece la digestión de las proteínas.

En la actualidad la papaya se cultiva en forma comercial no solo en las regiones de América, sino también en África y Asia. México ocupa el tercer lugar mundial en producción de papaya, después de Brasil y Nigeria, sin embargo ocupa el 1er. lugar como exportador, sus exportaciones representan el 36.7% del mercado mundial. Brasil es el segundo exportador mundial con el 12.2%. En nuestro país, en 2012 la superficie sembrada fue de 16 250 ha y una ganancia por hectárea de aproximadamente 2 700 000 pesos. Los estados productores de este fruto, que concentran el 80% de la producción son Colima, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, y Yucatán (SIAP, 2016).

La papaya, además de ser un excelente alimento, tiene aplicaciones en la industria. Algunos países han logrado incorporar valor agregado y se han convertido en exportadores de derivados, un ejemplo es Tanzania, que desarrolló técnicas para obtener sustancias de la pulpa y látex para utilizarlos en procesos industriales (Gómez y Pedrero, 2000).

La planta y el fruto de papaya son vulnerables a plagas y enfermedades, además que cuando se encuentran infectados es poco probable lograr su comercialización. Microorganismos como *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium* son patógenos cuyo daño se localiza alrededor de la base del tallo, provocan un estrangulamiento y muerte de las plantas. Otros hongos como *Phomosis* y *Colletotrichum* causan la pudrición del fruto. La pudrición del pedúnculo de la

papaya es causada por *Lasiodiplodia* spp. (Wang *et al.*, 2007). Este hongo es un parásito facultativo que generalmente infecta a sus plantas huéspedes penetrando a través de heridas y de tejidos en descomposición. Su principal hábitat son las regiones tropicales y subtropicales. Se han identificado como la causa de enfermedades en aproximadamente 280 especies de plantas vasculares (Alvidrez *et al.*, 2012).

El reciente descubrimiento de nuevas especies de *Lasiodiplodia* asociadas con plantas (Alves *et al.*, 2008) sugiere la existencia de más de una especie de *Lasiodiplodia* involucrada a la pudrición del pedúnculo de papaya en México. La etiología de la enfermedad es crucial para estudios epidemiológicos y para un mejor entendimiento de la distribución e importancia de las especies fúngicas, y también para el establecimiento de una estrategia y tratamiento efectivo para cada una de estas especies. Por lo tanto los objetivos de este estudio fueron identificar las especies de *Lasiodiplodia* responsables de la pudrición del pedúnculo de papaya en México, determinar la diversidad genética y virulencia de las mismas, así como identificar las enzimas secretadas por el hongo en las primeras fases de la infección.

A continuación, se muestra una breve sinopsis de los capítulos que integran el presente proyecto de investigación.

Capítulo I. Una breve introducción de la producción del cultivo de papaya a nivel mundial y nacional. Los usos que tiene el fruto, además de alimento son utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria, textil entre otras. Los distintos fitopatógenos que afectan al cultivo, enfocándose en las enfermedades causadas por hongos y organismos similares a los hongos.

Capítulo II. Se plantea una revisión de la literatura iniciando con las generalidades del cultivo, su taxonomía. Las distintas variedades que cultivan en el país, de la cual predomina la variedad Maradol y recientemente se produce Sensation y Tainung.

Capítulo III. Se refiere a un primer artículo, donde se revisa la literatura y se establece el estatus del hongo en México, se describe una lista de los cultivos hortifrutícolas que afecta y los distintos métodos de identificación empleados. Se aborda la taxonomía del hongo y la nueva propuesta de “One fungus one name”. También se aborda los métodos de control químico y biológico entre otros que se han aplicado para el patógeno.

Este artículo fue publicado en Julio de 2015, en la Revista Mexicana de Fitopatología (ISSN 2007-3368).

Capítulo IV. Se aborda la identificación del agente causal y se describe por primera vez al patógeno *Lasiodiplodia pseudotheobromae* afectando el cultivo de papaya en México. Esto en base a características morfológicas (presencia de estructuras sexuales o asexuales, forma y tamaño de los conidios) y en la secuenciación de regiones del ADN como los ITS y EF-1 α . También se determinó la patogenicidad y virulencia de los aislados, encontrando a *L. pseudotheobromae* como la especie más virulenta. Este artículo se enviará a la Revista Mexicana de Fitopatología (ISSN 2007-3368).

Capítulo V. Aquí estimamos la diversidad genética de los aislados, en base a su ubicación geográfica. Los marcadores moleculares utilizados fueron las secuencias simples repetidas (SSR), donde se encontró una variabilidad genética media alta en dos zonas, la vertiente del Océano Pacífico (con las poblaciones de Colima y Oaxaca) y la del Golfo de México (Veracruz), y se considera que existen barreras geográficas que limitan el intercambio genético entre poblaciones. Este artículo se enviará a la revista Genetic and Molecular Research (Online ISSN 1676 5680)

Capítulo VI. Se identificaron proteínas secretadas por *L. theobromae* en el inicio de la infección. Se determinó la actividad enzimática del hongo, encontrando proteínas implicadas en el proceso de patogénesis.

Capítulo VII. Conclusiones generales, este capítulo expone los aportes de esta investigación y su relevancia en la identificación de microorganismos fitopatógenos. Así como las perspectivas de la presente investigación.

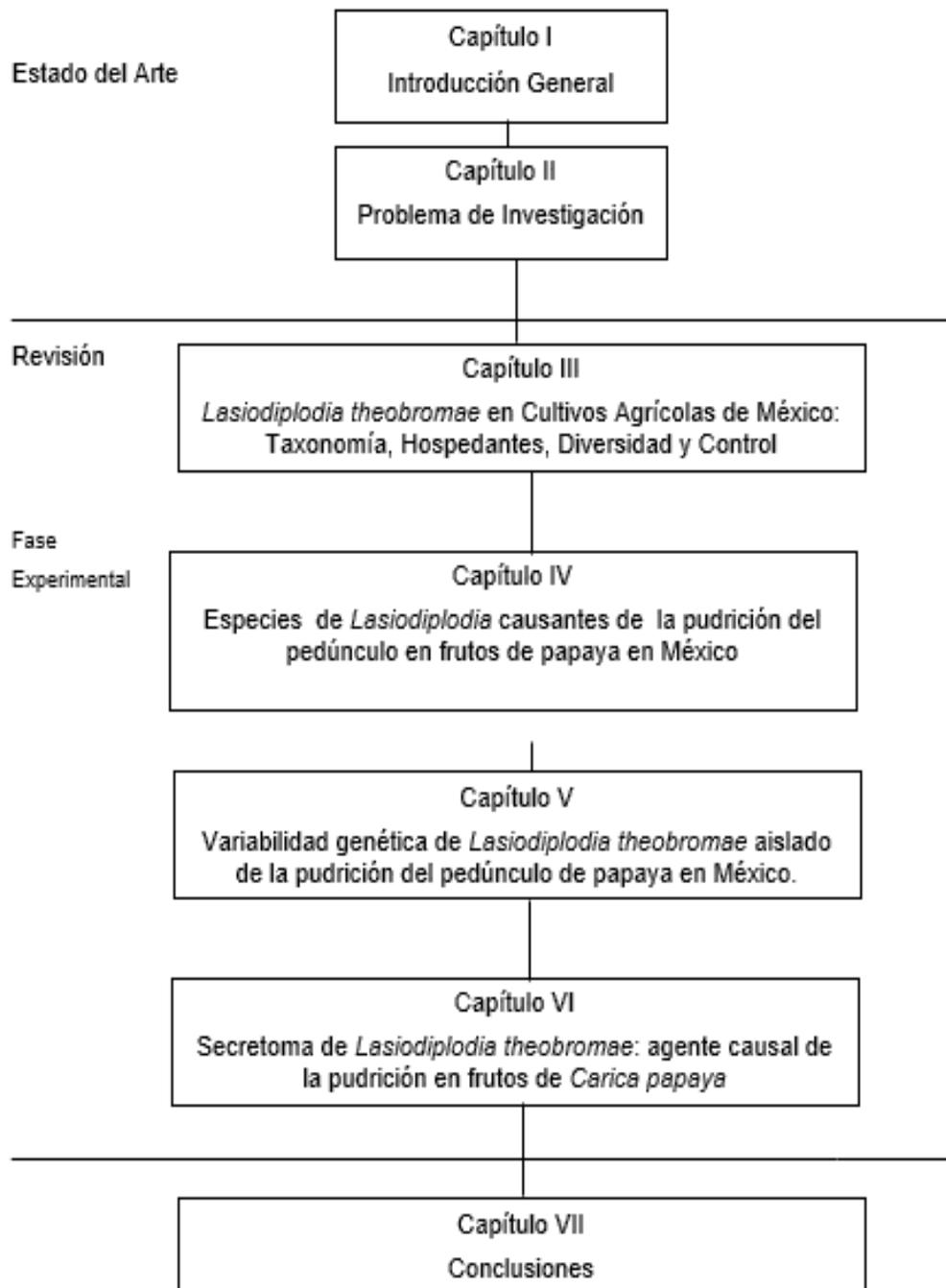


Figura 1. Esquema general que muestra la planificación de la investigación, así como la estructura general de la tesis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pudrición del pedúnculo en frutos de papaya es ocasionada por el hongo *Lasiodiplodia theobromae*, sin embargo se desconoce si *L. theobromae* es la única especie que causa la enfermedad en México. Por lo que con el presente trabajo se podrá determinar si existen otras especies involucradas, además su diversidad genética, virulencia y enzimas secretadas durante la infección *Lasiodiplodia* / fruto de papaya.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuántas son las especies de *Lasiodiplodia* responsables de la pudrición del pedúnculo de papaya en México?

¿Cuáles especies de *Lasiodiplodia* son más virulentas en frutos de papaya?

¿Cuál es la diversidad genética de *Lasiodiplodia* spp. de acuerdo al origen geográfico de los aislamientos?

¿Cuáles son las proteínas secretadas por *Lasiodiplodia theobromae* en el fruto de papaya?

HIPÓTESIS

Al menos dos especies de *Lasiodiplodia* están involucradas en la pudrición del pedúnculo en papaya en México.

Existe al menos una especie de *Lasiodiplodia* más virulenta que el resto de los aislados en frutos de papaya provenientes de los estados de Colima, Oaxaca y Veracruz.

Los niveles de variación genética de *Lasiodiplodia* spp. en papaya están determinados por la ubicación geográfica de la cual provienen los aislamientos.

Las proteínas secretadas durante la infección por *L. theobromae* en papaya son principalmente factores de virulencia.

OBJETIVOS

General

Identificar las especies y diversidad genética de *Lasiodiplodia* spp. causantes de la pudrición del pedúnculo en papaya, e identificar las enzimas secretadas en la interacción hospedante-patógeno.

Específicos

Caracterizar morfológica y molecularmente a *Lasiodiplodia* spp. provenientes de los cultivos de papaya de Colima, Veracruz y Oaxaca.

Determinar la virulencia de las cepas de *Lasiodiplodia* spp. aisladas de los frutos de papaya de Colima, Veracruz y Oaxaca.

Estimar la diversidad genética de aislados de *Lasiodiplodia* spp. de acuerdo a su ubicación geográfica de Colima, Veracruz y Oaxaca.

Identificar las proteínas secretadas por *Lasiodiplodia theobromae* durante la infección en frutos de papaya.

JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades del cultivo de papaya, ocasionadas por hongos se encuentran dentro de las más importantes a nivel mundial ya que ocasionan importantes pérdidas económicas. Una forma en que los hongos infectan a la planta y a los frutos es a través de las heridas producidas especialmente durante la poda y cosecha. El conocimiento de las poblaciones de *Lasiodiplodia* spp. que afectan al cultivo de papaya, su distribución y diversidad genética ayudarán al establecimiento de estrategias de control que reduzcan las pérdidas ocasionadas por el hongo.

CAPÍTULO II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Generalidades del Cultivo

La papaya fue descubierta por el conquistador español Hernán Cortés al sur de los estados de Tabasco y Yucatán en el año 1519. A medida que se expandían los dominios y la influencia española, la papaya se distribuyó a otras regiones como Filipinas, África y el Occidente (Posada, 2005).

Taxonomía y Clasificación.

Es una planta de la familia *Caricaceae*, la cual está compuesta por cuatro géneros *Carica*, *Cylicomorpha*, *Jacaratia* y *Jarilla*. Se conocen 30 especies con la siguiente distribución: *Carica* 21 especies, *Cylicomorpha* 2, *Jacaratia* 6 especies y *Jarilla* 1. Todas son originarias de los trópicos americanos, con excepción del género *Cylicomorpha* que es originario de África Ecuatorial. El género *Carica* es el más importante y entre las 21 especies, *C. papaya* es la de mayor importancia económica (Nakasone, 1994).

Descripción General de *Carica papaya* L.

Es una planta arbustiva de tronco hueco que alcanza 8 a 10 metros de altura y rara vez se ramifica. Esta especie es polígama y presenta formas hembras, machos y hermafroditas. Solo una especie, *C. goudotiana*, es de clima templado, que se ramifica libremente y por lo general es de baja altura, el resto de las especies son de climas tropicales a subtropicales. La fruta es esférica, piriforme, ovalada y alargada en su forma. Está compuesta por cinco carpelos en su presentación parietal; los carpelos se unen para formar una cavidad. La fruta con menos de cinco carpelos en la hembra, tiende a ser

alargada como el pepino (la pérdida de carpelos ocurre durante la transición de las flores hermafroditas normales a la esterilidad). El peso puede variar desde los 250 g hasta 7 kg, los colores de la pulpa de las frutas varían entre el amarillo al naranja rojizo en intensidad de pálido a fuerte según su contenido de carotenoides. La cavidad de la fruta varía entre el estrellado y redondo. Los sólidos solubles totales varían entre 5 y 18 % (León, 2000).

Variedades.

En las áreas cultivadas, las variaciones encontradas entre los numerosos tipos de papaya son muy amplias. Las variedades cultivadas de mayor exportación de nuestro país son:

Solo Sunrise. Es una variedad originaria de Hawái. La floración inicia a los cuatro meses después del trasplante y a una altura de 1 a 1.50 metros. Produce frutos en forma de pera y globosos, dependiendo del sexo, la pulpa es de color rojo y los frutos pesan entre 250 y 500 gramos en promedio; los sólidos solubles (azúcares) están en el orden de 13 a 14° Brix. La variedad puede producir plantas masculinas, femeninas y hermafroditas. Un problema con esta variedad es cuando se cultiva en áreas con temperaturas más bajas que las de Hawaii, manifiestan un grado intenso de carpeloidia y esterilidad femenina, siendo necesario hacer trabajos de adaptación (Jiménez, 2002, Guzmán, 1998).

Maradol. Esta variedad es de origen cubano. Por su tamaño se clasifica como semi enana, desarrolla un tronco grueso, exuberante follaje y entrenudos cortos. Descendencia compuesta por plantas hermafroditas para frutas alargadas y plantas femeninas para frutas redonda. Es una planta de porte bajo con floraciones y fructificaciones tempranas. Con buen manejo el primer corte se realiza 130 a 150 días después del trasplante. El color externo es amarillo naranja brillante y presenta un intenso color interior rojo salmón que

la hace muy apreciable al consumidor. El fruto es esférico, periforme, ovalado y/o alargado. Su peso varia, de 1500 a 2000 gramos. Su pulpa es de color rojo zapote intenso. Tiene una concentración de 12% Brix y sólidos solubles alrededor del 18%. Esta variedad tiene la desventaja de ser muy susceptible al virus de la mancha anular de la papaya. Por su consistencia posee una larga vida de anaquel y resistencia al manejo post cosecha y transporte (Jiménez, 2002).

Tainung. Las plantas son vigorosas y pueden medir a primera cosecha entre 2.50 a 3 metros de altura, desarrollan un follaje exuberante, inician la floración a tres meses de plantada en campo, la distancia entre nudos es corta, su producción de fruta es baja y es insignificante la carpeloidía lo mismo que la esterilidad, es resistente al Virus de la Mancha Anular de la Papaya. Las frutas de plantas hermafroditas, tienen forma alargada, presentando un verde brillante en pre cosecha, el tamaño de la fruta varía poco, con un peso promedio de 900 gramos, el largo promedio es de 20 centímetros y el ancho de 12 centímetros en relación con su tamaño. La cavidad es pequeña, no estrellada con pulpa suave y gruesa, su color es anaranjado intenso con 12 % Brix. Su cáscara y consistencia permite larga vida de anaquel y resistencia en el transporte (Gil y Miranda, 2005).

Sensation. Excelente calidad interna con pulpa roja de 4 cm de grosor y una dulzura que supera los 13° Brix. No tiene un olor fuerte sino muy agradable, similar a la hawaiana y tiene larga vida de anaquel y su comercialización puede ser tanto como fruta entera o como precortados. Las papayas tienen un peso de entre 0.40 y 1.2 kg (Lobo *et al.*, 2012)

Importancia del Cultivo de Papaya

La papaya tiene varios usos industriales. Bioquímicamente, sus hojas y frutos producen una diversidad de proteínas y alcaloides con importancia

farmacéutica e industrial (El Moussaoui *et al.*, 2001). La papaína, una importante enzima proteolítica, es producida en el látex de toda la planta, principalmente en el fruto inmaduro (Nakasone y Paull, 1998). Comercialmente la papaya tiene diversos usos. En biotecnología de alimentos es usada para la producción de goma de mascar, elaboración de cerveza, ablandamiento de carnes, en el desarrollo de sabores para la carne asada, para la producción de legumbres y frijoles deshidratados, en la mejora del índice de dispersibilidad de la proteína de harina de soya (Morton, 1987). En la industria farmacéutica es un componente de jabones, champú, lociones y productos para el cuidado de la piel, en la industria textil, para teñir telas, desgomado de la seda, ablandamiento de lana (Villegas, 1997). También tienen varios usos médicos y veterinarios, como la preparación de medicamentos y de vacunas; desparasitación de ganado; en el tratamiento de gangrena y piel dura; para reducir la hinchazón, fiebre y adhesiones después de la cirugía; y la disolución de las membranas en la difteria (Mezhlumyan *et al.*, 2003).

Pérdidas Poscosecha de Frutos

Dentro de las principales pérdidas poscosecha de frutos destacan las enfermedades, éstas reducen la calidad del fruto en campo y en el mercado, son las principales responsables de pérdidas que ocurren durante el transporte; el rango oscila entre el 10-40% en transporte terrestre y de 5-30% en transporte aéreo, pudiendo alcanzar hasta el 75% en la fase de comercialización. Las pérdidas ocasionadas por enfermedades varían dependiendo del manejo pos cosecha y los procesos de empaque (Álvarez y Nishijima, 1987; Nakasone y Paull, 1998).

Enfermedades del Cultivo de Papaya

Las enfermedades más importantes que limitan su producción son: las producidas por hongos y microorganismos parecidos a hongos como la

podrición del pie en plántulas (*Pythium* sp., *Phytophthora* sp y *Rhizoctonia*), podrición radicular en plantas adultas (*Pythium* sp. y *Fusarium* sp.), podrición del tallo (*Phytophthora* sp), antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*), mancha del fruto (*Alternaria* sp), mancha negra (*Asperisporium caricae*), podrición negra (*Mycosphaerella caricae* y *Cercospora papayae*), podrición café (*Corynespora cassiicola*), podrición del fruto (*Fusarium solani*), cenicilla (*Sphaerotheca caricae-papayae*, *S. humuli*, *Oidiopsis taurica*), podrición del pedúnculo (*Lasiodiplodia theobromae*, *Mycosphaerella* sp., *Phomopsis* sp). Otras causadas por virus como la mancha anular de la papaya, mosaico de la papaya, o por micoplasmas como el achatamiento terminal. También están las enfermedades producidas por bacterias como el cáncer bacteriano (*Erwinia* sp) y el amarillamiento interno (*Enterobacter cloacae*) (Naqvi, 2004).

Síntomas

El desarrollo de síntomas sobre el pedúnculo y frutos de papaya cosechados varía de acuerdo al hongo involucrado. En infecciones por *L. theobromae* se observan lesiones iniciales difusas, acuosas que se originan en el pedúnculo en forma de proyecciones de huellas dactilares, las cuales oscurecen y coalescen rápidamente alrededor de la base del pedúnculo formando márgenes ondulados. La necrosis generalmente permanece por debajo de la cutícula, invadiendo el fruto entero en una semana si prevalecen las condiciones ambientales favorables (alta temperatura y humedad relativa). Puede aparecer micelio superficial alrededor del pedúnculo a través de heridas en la epidermis, así como un exudado acuoso de color café. La producción de picnidios sobre la superficie del fruto comienza alrededor del pedúnculo y es una característica típica para el diagnóstico (Naqvi, 2004; Netto *et al.*, 2014).

Literatura Citada

- Alvidrez, R, Hernández, F, Garcia, O, Mendoza, R, Rodríguez, R. Aguilar, C. 2012. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. *Agricultural Sciences* 3: 405-416.
- Álvarez, M. Nishijima, T. 1987. Postharvest diseases of papaya. *Plant Disease* 71:681-686.
- El Moussaoui A, Nijs M, Paul M, Wintjens R, Vicentelli J, Azarkan M, Looze Y. 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell and Molecular Life Sciences* 58: 556-570.
- Gil A, Miranda D. 2005. Floral and seed morphology of papaya (*Carica papaya* L.): Maradol variety and Tainung-1 hybrid. *Agronomía Colombiana*. 23(2):217-222.
- Gómez R, Pedrero R. 2000. Generalidades de la producción de papaya en México. *Plantaciones Modernas* 5: 27-34.
- Guzmán A. 1998. Guía para el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) Ed. Ministerio de Agricultura y Ganadería Costa Rica. pp 10-20.
- Jiménez, J. 2002. Manual práctico para el cultivo de la papaya hawaiana. 1 ed. Earth 20-22.

- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. Agroamerica Costa Rica. 3 ed. 140-142.
- Lobo G, Pérez E, Perrera S. 2012. Estudio preliminar de parámetros postcosecha de cinco variedades de papaya en Tenerife. Informe Técnico Cabildo de Tenerife.
- Mezhlumyan L, Kasymova T, Yuldashev P. 2003. Proteinases from *Carica papaya* latex. Chemistry of Natural Compounds 39: 223-228.
- Morton J. 1987. Papaya *Carica papaya* L. In: Fruits of Warm Climates. Creative Resources Inc., Winterville, N. C. 336-346.
- Nakasone H. 1994. Papaya. In Ploetz, RC *et al.* eds. Compendium of tropical fruit disease. Minnesota, US, APS Press. 56-57.
- Nakasone H, Paull R. 1998. Tropical Fruits. CAB International, Wallingford.
- Naqvi, S. 2004. Diseases of Fruits and Vegetables, Diagnosis and Management Volume II. Kluwer Academic Publisher 201-268.
- Posada L. 2005. Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. Biotecnología Vegetal 5(2): 67-79.
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Producción agrícola de papaya Maradol en modalidad riego más temporal. SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx> (Acceso Abril 2016).

Villegas V. 1997. *Carica papaya* L. *In*: EWM Verheij, RE Coronel, eds. Plant Resources of South-East Asia 2: Edible Fruits and Nuts. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia.

Wang H, Chen P, Ni H, Chen S. 2007. Physiological characterization and screen of control chemicals for *Lasiodiplodia theobromae* of papaya. 2007. Plant Pathology Bulletin 16: 71-77.

CAPÍTULO IV. ARTÍCULO DE REVISIÓN

Lasiodiplodia theobromae en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control

Picos Muñoz PA, García Estrada RS, León Felix J, Sañudo Barajas A y Allende Molar R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 54-74.

Resumen

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* es el agente causal de numerosas enfermedades de plantas en una gran variedad de hospederos. Los cultivos hortofrutícolas son particularmente sensibles a la infección por este hongo. Aunque, en México *L. theobromae* está asociado con la muerte descendente y pudrición de frutos como mango, uva, papaya, rambután, zapote y cítricos aún es escaso el número de reportes relacionados con enfermedades causadas en diferentes especies vegetales. La taxonomía de *L. theobromae* ha mostrado importantes progresos, con la caracterización de las regiones espaciadoras intergénicas y factor de elongación 1 alfa se ha podido esclarecer su ubicación filogenética y su diferenciación con especies crípticas, lo que ha incrementado los reportes en nuevos huéspedes vegetales. El objetivo de esta revisión es el dar a conocer el estatus de *L. theobromae* en México.

Palabras clave: *Botryosphaeriaceae*, muerte descendente, pudrición de frutos, pudrición del pedúnculo.

Abstract

Lasiodiplodia theobromae is the causal agent of numerous plant diseases in a wide variety of hosts. The fruit and vegetable crops are particularly susceptible to infection by this fungus. Although in Mexico, *L. theobromae* is associated with dieback and fruit rot in mango, grapes, papaya, rambutan, sapote mamey and citrus fruit, reports of this fungus on diseases of different plant species are still missing. The taxonomy of *L. theobromae* has shown important progress, with the characterization of the intergenic spacer regions and elongation factor 1 alpha their phylogenetic location and cryptic species differentiation have been clarified and an increase of reports on new plant hosts has been made. Therefore the aim of this review is to present the status of *L. theobromae* in Mexico.

Key words: *Botryosphaeriaceae*, dieback, fruit rot, stem-end rot

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon and Maubl. es la especie tipo del género *Lasiodiplodia* es un hongo que fue descrito por primera vez alrededor de 1890 por Saccardo, afectando frutos de cacao (*Theobroma cacao*) en Ecuador (Crous y Palm, 1999). Este hongo es cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, especialmente de los trópicos y subtrópicos. Es un hongo pleomórfico y ubicuo, por lo cual ha tenido más de un sinónimo (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Las enfermedades ocasionadas por este patógeno incluyen muerte descendente, cáncer, gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz en plantas maderables y cultivos (Pitt y Hocking, 2009; Shahbaz *et al.*, 2009). *L.*

theobromae es saprófito pero se le considera un patógeno latente, encontrándose como endófito en tejidos sanos de la planta, convirtiéndose en patógeno cuando el hospedero está debilitado o estresado (Rubini *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2005); también se ha reportado como un patógeno oportunista de humanos causando infecciones subcutáneas, oculares y de órganos internos (Rebell y Forster, 1976; Maslen *et al.*, 1996; Summerbell *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2008). A nivel mundial existen registros de *L. theobromae* afectando cultivos frutales de mango (Jonhson, 1992), aguacate (Pegg *et al.*, 2003), papaya (Queiroz *et al.*, 1997), plátano (Alves *et al.*, 2008), rambután (Sivakumar *et al.*, 1997), litchi (Liu *et al.*, 2005), uva (van Niekerk *et al.*, 2004), guanábana (Lutchmeah, 1988), anacardo (Cardoso *et al.*, 2002), cítricos, duraznos (Damn *et al.*, 2007) y longan (Serrato-Díaz *et al.*, 2014) entre otros, causando pérdidas económicas en las distintas etapas de la producción.

En años recientes se ha establecido su relación filogenética con especies crípticas a través del análisis de ADN en fragmentos de las regiones espaciadoras intergénicas (ITS) y el factor de elongación 1 alfa (EF-1 α), lo que ha permitido resultados más claros de su ubicación en relación a especies similares o cercanamente relacionadas (Pavlic *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

La etiología de la enfermedad es crucial para estudios epidemiológicos y para una mejor comprensión de la distribución e importancia de este hongo, así como para establecer estrategias y tratamientos de control efectivo. El objetivo de este escrito es describir el estatus de *L. theobromae* afectando distintos cultivos frutales y maderables en México así como la compilación de los resultados publicados de los cultivos afectados enfocándose en aspectos de biología, patogenicidad, epidemiología y estrategias de control de este hongo en nuestro país.

Taxonomía

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* se clasifica dentro de los Ascomicetos en el orden Botryosphaerales y en la familia *Botryosphaeriaceae* (Schoch *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2013); presenta un estado sexual (teleomorfo), poco común *Botryosphaeria rhodina*. Sin embargo no existen descripciones recientes de su estado sexual, por lo cual se ha reportado que éste se encuentra perdido (Phillips *et al.*, 2008). El estado sexual de este hongo necesita clarificarse, los resultados que se tienen hasta ahora han sido inconclusos dado que no se han encontrado subsecuentes reportes que confirmen esta conexión (Alves *et al.*, 2008).

L. theobromae tuvo como sinónimo a *Diplodia theobromae* (Alvarez, 1976; Denman *et al.* 2000). En años recientes estudios filogenéticos, basados en las regiones ITS, realizados por Zhou y Stanosz (2001), Slippers *et al.* (2004) y Phillips *et al.* (2008) muestran que los clados de estos dos géneros están separados entre sí. Además, morfológicamente los dos géneros son claramente distintos. Por ejemplo, las estrías de los conidios están presentes solo en *Lasiodiplodia* de igual manera la forma sexual, se ha reportado solamente en *L. theobromae*. Por lo anterior, no hay razón para considerar a estos dos géneros como sinónimos (Phillips *et al.*, 2013).

Por mucho tiempo se consideró a *Botryodiplodia theobromae* Pat. (1892) como el basionimo de *L. theobromae*, el cual fue descrito en la planta *Theobroma cacao* en Ecuador; sin embargo, Crous y Palm (1999) examinaron el tipo original conservado en Pennsylvania y encontraron un ascomiceto valsoide por lo que el nombre de *Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc. se considera *nomen dubium* (nombre incierto). Por otro lado, no se ha encontrado el holotipo de *L. theobromae* en herbario alguno (Pavlic *et al.*, 2004) con lo que se presume que se perdió con el tiempo. Hecho por el cual, Phillips *et al.* (2013) designaron un neotipo aislado de un fruto indefinido del arrecife de coral de la costa este en Papua Nueva Guinea, lejos de la localidad del holotipo y del

substrato original (planta de cacao), considerando este neotipo como una cepa de referencia para *L. theobromae*.

En relación a su teleomorfo, a través del tiempo la taxonomía superior del género *Botryosphaeria* (estado sexual de *Lasiodiplodia theobromae*) ha tenido diferentes modificaciones. Slippers *et al.* (2013) indica que en un inicio el género fue asignado a la familia *Melogrammataceae*, dentro del orden Sphaeriales; posteriormente, fue situado en la familia *Pseudosphaeriaceae* que agrupaba taxones con un solo lóculo y ascostromata multiascal, dentro del orden Dothideales, posteriormente se creó la subfamilia *Botryosphaerieae* y fue colocado en ésta, pero no se le ubicó dentro de un orden. Un año después, se le designó en el orden Myriangiales, posteriormente se creó la subclase Dothideineae dentro del nuevo orden Pseudosphaeriales y la nueva familia *Botryosphaeriaceae*. Una de las razones principales de esta reorganización en la clasificación de *Botryosphaeria* fue la confusión respecto a la ontogenia y morfología de verdaderos peritecios, ascostromata y tejido intersticial (Denman *et al.*, 2000; Slippers *et al.*, 2013).

En los últimos años, debido principalmente a la disponibilidad de herramientas moleculares basadas en el ADN recombinante, ha surgido una taxonomía más sólida para este grupo de hongos. Hasta hace una década la posición del género en la clasificación más alta de los ascomicetes no había sido resuelta (Denman *et al.*, 2000). Estudios filogenéticos señalan la posición de la familia *Botryosphaeriaceae* en la clase Dothiideomycetes, situándola dentro de Botryosphaeriales, un nuevo orden e independiente de los órdenes Pleosporales y Dothideales (Crous *et al.*, 2006). Actualmente se reconocen 6 familias dentro de este orden: *Botryosphaeriaceae* (con 17 géneros), *Phyllostictaceae* (*Phyllosticta*), *Planistromellaceae* (*Kellermania*), *Aplosporellaceae* (*Aplosporella*, *Bagnisiella*), *Melanopsaceae* (*Melanops*) y *Saccharataceae* (*Saccharata*) (Slippers *et al.*, 2013).

Los análisis basados en la secuenciación de ADN han originado cambios significantes en la nomenclatura, identificación y circunscripción de especies en *Botryosphaeriaceae*. Estos cambios son resultados de la

implementación de una sola nomenclatura para todas las formas (sexual y asexual) de una especie (Hawksworth *et al.*, 2011), incluyendo la descripción de especies crípticas basadas en las secuencias de ADN donde los caracteres morfológicos no son suficientes para este propósito (Pavlic *et al.*, 2009; Sakalidis *et al.*, 2011). Estudios contemporáneos de la familia *Botryosphaeriaceae* apoyan esta moción, basándose en que las características morfológicas usadas típicamente para la clasificación de especies (forma del conidio o ascosporas y sus dimensiones, septación y pigmentación) son frecuentemente poco fiables. También los datos ecológicos y geográficos son difíciles de interpretar cuando algunas especies tienen varios huéspedes, y un huésped tiene distintas especies (Slippers *et al.*, 2009). Por esta razón la mayoría, si no es que todos, los taxa incluyen la secuencia de ADN y su inferencia filogenética para redefinir estas clasificaciones (Slippers *et al.*, 2013). Por ejemplo, Liu *et al.* (2012) se basaron en la amplificación y secuenciación de distintas regiones del genoma usando los oligonucleótidos NS1 y NS4, LROR y LR5, ITS4 e ITS5, EF2-728 F/ EF2-968F y Bt2a y Bt2b (Que amplifican la región de la subunidad pequeña del gen ribosomal nuclear, un segmento de la subunidad grande del gen RNA ribosomal, las regiones espaciadoras intergénicas del rDNA, un segmento del factor de elongación 1-alfa y un segmento del gen de β -tubulina, respectivamente) con el objetivo de reordenar a la familia *Botryosphaeriaceae* aceptando 29 géneros y 1485 especies, aclarando que faltan especies no descritas aún y algunos complejos de especies. También se reordenó el género *Macrovalsaria* en esta familia, el cual es monotípico, es decir con una sola especie *M. megalospora*, la cual se encuentra solamente en estado sexual y esta genéticamente cercana a *Lasiodiplodia* spp. Algunos consideran este género como el estado sexual de *Lasiodiplodia* spp. pero aún faltan estudios más profundos para confirmar esta proposición (Liu *et al.*, 2012).

Cambios recientes en la taxonomía de hongos, según la nomenclatura de algas, hongos y plantas (Código Melbourne), establecen solo un nombre para cada especie de hongo, ya que durante más de 100 años el código

permitió los nombres de la fase asexual y la sexual de una sola especie (Rico, 2011). El género *Lasiodiplodia* se considera válido y se encuentra en la lista pendiente de aprobación por el comité de nomenclatura de hongos, lo cual podría ocurrir en el próximo congreso internacional de botánica en China en el año 2017 (Kirk *et al.*, 2013; Wijayawardene *et al.*, 2014).

Biología

Fisiología y Morfología. La principal característica que distingue al género *Lasiodiplodia* de otros géneros cercanamente relacionados es la presencia de picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en conidios maduros. Cerca de 20 especies han sido descritas en base a la morfología de conidios y paráfisis. Las descripciones más recientes de estas especies, aparte de la morfología, se basan en la secuenciación de las regiones espaciadoras intergénicas del rDNA (ITS) y factor de elongación 1 alfa (EF-1) (Damm *et al.*, 2007; Netto *et al.*, 2014).

La morfología de su ascocarpo es de color café oscuro a negro, agregado, con pared gruesa de color café oscuro y hialino en capas internas, de 250-400 μm de diámetro. El asca es bitunicada, estipitada, con 8 esporas, de 90-120 μm de longitud. Las ascosporas son biseriadas, hialinas, aseptadas de 30-35 x 11-14 μm . El conidiomata es estromático, simple o agregado, inmerso en el hospedero y una vez maduro emerge de éste, de color café oscuro, unilocular, de pared gruesa o delgada de color marrón, con frecuencia setoso, de hasta 5 mm de ancho, ostiolo central, único, papillado. Paráfisis hialinas, cilíndricas, tabicadas, ocasionalmente ramificadas con los extremos redondeado hasta 55 μm de largo y 3-4 μm de ancho (Phillips *et al.*, 2013).

Los conidióforos son hialinos, simples, algunas veces septados, rara vez ramificados, cilíndricos. Las células conidiogénicas son hialinas, de pared gruesa, lisas, cilíndricas a sub-obpiriformes, holoblásticos, con una o dos anillaciones. Los conidios son subvoides a elipsoidales, con ápices ampliamente redondeados, que se estrechan para trincar la base, más ancha

a mediados del tercio superior, de paredes gruesas, con contenido granular, en un principio hialino y aseptados, convirtiéndose a café oscuro una vez maduros, con 1 septo, presentan depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuestos longitudinalmente dando una apariencia estriada con medidas de 21.5-31-5 x 13-17 μm y una proporción de 1.9 Largo/Ancho (Figura 1) (Pitt y Hocking, 2009; Phillips *et al.*, 2013).

Las colonias en medio de cultivo son moderadamente densas, con micelio aéreo, inicialmente blancas tornándose gris-olivo a los 7 días y con el tiempo adquieren un color negro. Las temperaturas de crecimiento para *L. theobromae* son 15 °C mínima, 28 °C como óptima y 40 °C como máxima (Slippers *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008). La esporulación del hongo es favorecida por fotoperiodos de más de 16 horas de exposición de luz lo que permite la formación de picnidios; por el contrario, una exposición menor a 4 horas de luz diaria en un periodo de 23 días inhibe la esporulación del hongo (Perera y Lago, 1986). La presencia de nitrógeno en el medio de cultivo favorece la esporulación; Saha *et al.* (2008) evaluaron la concentración de nitrógeno en distintos medios de cultivo, encontrando que el agar de papa dextrosa (PDA) adicionado con extracto de raíz de té induce a un crecimiento rápido y mayor del micelio, además de una concentración de esporas superior al resto de los medio evaluados.

Por muchos años, la fisiología de los aislamientos en la separación de especies del género *Lasiodiplodia* ha sido tema de controversia. Por ejemplo, Alves *et al.* (2008) distinguieron a *L. parva* y *L. pseudotheobromae* de *L. theobromae* basados en la habilidad de las dos primeras de producir un pigmento rosa en medio PDA a 35 °C; también reportaron que *L. pseudotheobromae* era la única que crecía a 10 °C. En contraste, Abdollahzadeh *et al.* (2010) encontraron que *L. theobromae* a 35 °C producía una fuerte pigmentación rosa en PDA, además de que las tres especies crecían a 10 °C. Entonces, las características fisiológicas tienen un valor limitado para determinar la separación de especies ya que existe una gran

variabilidad en las características fisiológicas entre los aislamientos de una misma especie.

Estudios filogenéticos. Al considerar la similitud en diversas secuencias de ADN, distintos géneros se agruparían con *Lasiodiplodia* al grado de considerarlos sinónimos de éste. Phillips *et al.* (2013) considera a *Macrovalsaria* en el grupo de este género. Esto también fue señalado por Liu *et al.* (2012), aunque no encontraron suficiente evidencia en las regiones LSU y SSU para realizar este cambio y establecerlo como un sinónimo.

Por otro lado, aunado a la presencia cosmopolita, el amplio número de huéspedes y la variabilidad morfológica de *L. theobromae*, existen varias especies crípticas. Por ejemplo, Pavlic *et al.* (2004) describió a *L. gonubiensis* Pavlic, Slippers & Wingf en base a la morfología y dimensiones de sus conidios y en la secuenciación de las regiones ITS. Posteriormente, Burgess *et al.* (2006) describieron a *L. crassispora*, *L. venezuelensis* y *L. rubropurpurea* en base a las regiones ITS y EF1- α y a las características morfológicas. Otras especies que se consideran crípticas son *L. parva* y *L. pseudotheobromae* (Alves *et al.*, 2008), las cuales están separadas por el tamaño y forma del conidio. En *L. pseudotheobromae* el conidio es más grande y elipsoidal que en *L. theobromae*. También, *L. parva* es fácilmente distinguible de las otras dos especies ya que sus conidios son más pequeños. Otra especie que se considera críptica es *L. mahajangana*, la cual es filogenéticamente cercana a *L. theobromae* pero morfológicamente distinta pues la primera tiene conidios relativamente más pequeños de 17.5-11.5 μm (Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

Los marcadores SSR se han usado recientemente para examinar genes y genotipos, modos reproductivos y especiación de un número de hongos, incluyendo *Botryosphaeria* spp. y sus anamorfos (Burgess *et al.*, 2006; Mohali *et al.*, 2005). Una investigación sugiere que existen barreras geográficas para el intercambio de genes entre *L. theobromae*, basándose en los marcadores SSR, con aislados de Venezuela, México y Sud África (Mohali *et al.* 2005). Shah *et al.* (2010) analizaron 30 aislados de *L. theobromae* del cultivo de pera

en India, encontrando una alta diversidad genética entre los aislados provenientes de distintas zonas geográficas y poca diversidad genética entre los aislados de la misma zona geográfica.

Otros estudios de diversidad genética proponen que dos especies crípticas de *Lasiodiplodia* (*L. theobromae* y *L. pseudotheobromae*), no han sido encontradas y estudiadas en el mismo huésped por lo que no se ha podido establecer si en algún momento ocurrió alguna hibridación entre ambas (Begoude *et al.*, 2010). Al-Sadi *et al.* (2013) encontraron un moderado nivel de diversidad genética en poblaciones de tres especies de *Lasiodiplodia* provenientes de distintos huéspedes y orígenes geográficos, y un alto número de genotipos (no especificados) de *L. theobromae*, *L. hormozganensis* y *L. iraniensis* en Omán UAE (Emiratos Árabes Unidos), también encontraron que *L. hormozganensis* difería mayormente con *L. theobromae* en cuanto a diversidad genética, sugiriendo que *L. hormozganensis* por mucho tiempo fue erróneamente identificada como *L. theobromae*, debido a que solo se disponía de identificación por caracteres morfológicos de especies y a que la primera es especie críptica de la segunda.

Patogenicidad y virulencia. La especie *L. theobromae* es más virulenta en comparación con otros géneros y especies de la familia *Botryosphaericeae*. Por ejemplo, Úrbez-Torres *et al.* (2008) encontraron que *L. theobromae* es más virulenta que *Diplodia seriata* en el cultivo de vid ya que ocasiono lesiones de mayor tamaño en los tallos inoculados. En frutos de mango *L. theobromae* mostró una virulencia media-alta en comparación con *L. egyptiacae* y *L. pseudotheobromae* (Ismail *et al.*, 2012); en contraste, Marques *et al.* (2013) describió a *L. theobromae* con una virulencia media comparada con *L. hormozganensis* siendo ésta la más virulenta, ocasionando lesiones de 33.6 mm de diámetro en el fruto.

Umezurike (1979) menciona la actividad celulítica del hongo, el cual ataca a la planta de manera similar a un hongo de pudrición suave, usando el

almidón y otros sacáridos presentes en el sustrato inicial de la madera antes de la degradación de celulosa y hemicelulosa, aunque no degrada la lignina.

Sintomatología y epidemiología. En la pudrición del fruto y del pedúnculo, la enfermedad está condicionada a alta temperatura y humedad relativa (Ploetz 2003). Las lesiones ocasionadas por *L. theobromae* en frutos de mango son inicialmente difusas, acuosas-hundidas dispersándose desde el pedúnculo en forma de proyecciones de huellas dactilares, las cuales oscurecen y coalescen rápidamente alrededor de la base del pedúnculo formando márgenes ondulados. La necrosis ocurre debajo de la cutícula, invadiendo la pulpa del fruto y llegando a momificarlo. Se llegan a observar picnidios primero sobre el pedúnculo y después sobre el fruto; además, de las lesiones puede fluir un exudado café (Ploetz, 2003; Ventura *et al.*, 2004).

La principal vía de entrada de *L. theobromae* a los hospederos es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos o causas naturales (Ploetz, 2003). Se ha reportado que durante los periodos lluviosos hay mayor producción de esporas las cuales pueden ser diseminadas por las gotas de lluvia y el viento (Vázquez *et al.*, 2009). El hongo coloniza el sistema vascular y avanza por delante de los síntomas visibles (Burgess *et al.*, 2006; Shahbaz *et al.*, 2009). El hongo sobrevive sobre tejidos muertos en el árbol o suelo (Pegg *et al.*, 2003) y especialmente en frutos momificados (Ploetz, 2003). La incidencia de *L. theobromae* está influenciada por la temperatura (mayor a 30° C), al estrés hídrico y bajos niveles de nutrición de la planta (Khazada *et al.*, 2005). Cuando los frutos son infectados en el árbol, el patógeno puede permanecer quiescente hasta que los frutos maduran. En postcosecha, los frutos pueden ser infectados al colocarlos sobre el suelo después de cosechados o a través del contacto físico de un fruto sano con uno enfermo (Ventura *et al.*, 2004).

Reportes en México

Lasiodiplodia theobromae ha sido reportado en México causando distintas enfermedades en varios cultivos principalmente frutícolas (Cuadro 1). El reporte más antiguo encontrado de este patógeno es el realizado por Álvarez (1976) afectando el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*). Otros cultivos que también reporta son: aguacate (*Persea americana*), papaya (*Carica papaya*) y árbol del caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.) bajo el nombre de *Diplodia theobromae*, en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) como *Diplodia cacaoicola*, en chirimoya (*Annona cherimola* Mill) y durazno (*Prunus persica*) como *Diplodia natalensis* causando la pudrición del fruto y gomosis, respectivamente.

La mayoría de las descripciones de este patógeno han sido en base a características morfológicas y es a partir de la década pasada que se ha complementado la identificación con técnicas de biología molecular. Entre los reportes basados solamente en morfología se encuentran los realizados en el cultivo de mango (*Mangifera indica*) en el estado de Veracruz, donde las condiciones ambientales agravan la situación pues las lluvias no permiten que el árbol recupere su follaje (Mosqueda *et al.*, 1996). También, Romero (1993) realizó una descripción de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas de México y reportó a *B. theobromae* afectando los frutos de los cultivos de mango, chirimoya, algodón, yuca, camote y barbasco. Otros reportes con el nombre de *Botryodiplodia theobromae* son los de Becerra (1995) afectando el cultivo de mango en Michoacán Nayarit y Veracruz, donde la humedad favorece la aparición del fitopatógeno. Tucuch *et al.* (2005) reportan a *B. theobromae* como el agente causal de la muerte descendente en mango en Campeche, en donde la enfermedad se presenta en mayor intensidad cuando la humedad relativa es mayor al 80% y temperatura entre 26 a 32 °C, manifestándose un secamiento en forma progresiva y descendente con puntos negros en la corteza, en las hojas inicia con lesiones de color gris pardo ocasionando una fuerte defoliación causando la muerte del árbol. Además de

los reportes anteriores, también existen otros donde solo se designó como agente causal a *Lasiodiplodia* sp. en marañón (*Anacardium occidentale*) causando necrosis en frutos en Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Canales, 2007). También Canales (1998) describe el cáncer de tronco y ramas en mango bajo el nombre de *Botryodiplodia* sp., además de inducir la floración al ocasionar un estrés hídrico en las ramas y provocar un efecto de anillado. En otros cultivos, basados únicamente en características morfológicas, se incluyen los realizados por Bautista-Baños *et al.* (2002) en donde reportan a *B. theobromae* como el agente causal de la pudrición de frutos maduros de mamey; Martínez (2010) reporta a *L. theobromae* afectando flores de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), Hernández (2010) lo reporta como agente causal de la mancha negra de rambután (*Nephelium lappaceum*) en poscosecha, Hernández *et al.* (2013) lo reportan asociado a la muerte descendente de ramas en guanábana (*Annona* spp), aunque aún son necesarias pruebas de patogenicidad que comprueben que es el agente causal de la enfermedad y Varela *et al.* (2013) lo describen como el agente causal de la muerte de plantas de naranjo agrio injertadas con diferentes especies de cítricos en viveros, de la muerte de ramas en en árboles de limón mexicano y de la la pudrición del pedúnculo en frutos de naranja.

Entre los reportes que consideran además de las características morfológicas, alguna caracterización molecular se encuentran los de Úrbez-Torres *et al.* (2008), quienes identificaron a *L. theobromae* ocasionando cáncer de la vid en el norte de México y el sur de Estados Unidos de Norteamérica, para su identificación y caracterización se basaron en las regiones ITS1-5.8S e ITS 2, una región parcial del gen de beta tubulina (β - tubulina), y parte del gen del factor de elongación 1 alfa (EF1- α); Vázquez *et al.* (2009) reportaron a *L. theobromae* afectando varetas de zapote e identificaron al patógeno mediante características morfológicas y la secuenciación de las regiones ITS. En el árbol de la nuez (*Carya illinoensis*), se encontró a *L. theobromae* en asociación a un coleóptero como el agente causal de la pudrición del fruto; el hongo fue identificado en base a las características morfológicas y a la

secuenciación de las regiones ITS (Alvidrez-Villarreal *et al.*, 2012). En el cultivo de mango (*Mangifera indica*) se reportó además de *L. theobromae* a *L. pseudotheobromae* (especie críptica de la primera) ocasionando pudrición del pedúnculo y muerte descendente, respectivamente. La identificación de las especies se basó en características morfológicas y en la amplificación y secuenciación de las regiones ITS (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). En papaya (*Carica papaya*), Rojo (2013) identificó, mediante características morfológicas y la secuencia de regiones ITS, a *L. theobromae* como responsable de pudrición del pedúnculo en poscosecha.

Control. Numerosos son los estudios realizados para controlar a *L. theobromae* una vez detectado en el cultivo. Li *et al.* (1995) evaluaron fungicidas contra *L. theobromae* y *Botryosphaeria dothidea* causantes de gomosis en duraznos y albaricoque, encontrando que el fungicidas metil-tiofanato inhibió el crecimiento micelial, la germinación de conidios y controló el desarrollo de la enfermedad en árboles de albaricoque; también reportaron que los fungicidas asperjados, metil-tiofanato 70WP y carbendazima 50WP se pueden usar como tratamiento auxiliar para prevenir la infección del patógeno.

Por otro lado, Tamayo (2007) recomienda la utilización de hipoclorito de calcio y carboxin/captan, a fin de prevenir posibles pudriciones o la manifestación del hongo en el semillero, y antes del almacenamiento se deben sumergir los frutos en una solución fungicida a base de procloraz. También recomienda aspersiones precosecha con fungicidas a base cobre, benomil, metil tiofanato, carbendazim o tiabendazol en forma rotativa a fin de evitar la aparición de poblaciones del patógeno resistentes a los fungicidas.

En un estudio de evaluación de la sensibilidad de *L. theobromae* hacia dos grupos de fungicidas se concluyó que un 91.6% de 120 aislados provenientes de huertos de papaya fueron sensibles a los ingredientes activos del grupo de carbamatos del tipo metil benzimidazol (benomyl y tiabendazol). En cuanto al grupo de fungicidas del tipo inhibición por demetilación (Imazalil, procloraz, tebuconazol) se encontró gran variabilidad en cuanto al grado de

sensibilidad de los aislados analizados concluyendo que *L. theobromae* es menos sensible a este grupo de fungicidas (da Silva *et al.*, 2012).

En poscosecha, Barbosa-Martínez *et al.* (2002) evaluaron el efecto del ozono, yodo y cloro en la germinación de esporas de *L. theobromae* aislado de frutos de mango y encontraron que en la aplicación de yodo (500 mg.L⁻¹) la germinación de esporas de *L. theobromae* fue de 10%; mientras que con ozono (2.2 mg.L⁻¹) y cloro (360 mg.L⁻¹) la germinación de esporas fue de 30 y 40%, respectivamente.

Tovar *et al.* (2013) reportaron que la combinación de lavado y posterior aplicación de tiabendazol redujo la incidencia de la enfermedad ocasionada por *L. theobromae* hasta un 81% en injertos de zapote. Los fungicidas ciprodinil+fludioxinil, piraclostrobin+boscalid, procloraz, tebuconazol, iprodione fueron eficaces para inhibir el crecimiento micelial de *L. theobromae in vitro*.

En cítricos, Varela *et al.* (2013) reportan la aplicación de benomyl y compuestos a base de oxiclورو de cobre contra *L. theobromae* en las distintas etapas del cultivo. Canales (1998) sugiere, para el control del cáncer de tronco y ramas de mango, realizar una cirugía en los cánceres hasta eliminar el tejido dañado y aplicar Benlate®, Tecto 60® o Derosal 50® en las heridas. También en mango, en la muerte descendente se recomienda podar las heridas y realizar aspersiones de fungicidas a base de cobre cada 15-20 días, también se puede aplicar los productos Captán, Maneb, Zineb y Benomyl, desde el inicio de la floración hasta un mes antes de la cosecha (Tucuch *et al.*, 2005). En marañón se recomiendan podas sanitarias y tratamiento preventivo con fungicidas a base de oxiclورو de cobre o azufre como ingrediente activo antes de iniciar la floración; durante la floración y formación del fruto se puede utilizar un fungicida sistémico a base de Fosetyl-al, Metalaxil-m o Triforine para reducir la incidencia de la necrosis en frutos (Canales, 2007).

Conclusiones

Lasiodiplodia theobromae es un patógeno con escasos estudios de patogenicidad y rango de hospederos en México. La mayoría de los reportes de *L. theobromae* se han basado en características morfológicas. El complejo de especies crípticas asociadas a *L. theobromae* requiere de estudios que asocien características morfológicas y moleculares o genéticas. Las prioridades de los programas de investigación deberían enfocarse en cuantificar el impacto que ocasiona este hongo en diversos cultivos, así como determinar el modo de infección y la evaluación de susceptibilidad a productos químicos para establecer lineamientos de una estrategia efectiva de control.

Agradecimientos

Al proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financiado por SAGARPA-CONACYT y al CONACYT por el financiamiento a los estudios de P. A. Picos-Muñoz

Literatura Citada

- Abdollahzadeh J, Javadi A, Mohammadi-Goltapeh E, Zare R and Phillips AJL. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.
- Al-Sadi A, Al-Wehaibi A, Al-Shariqi R, Al-Hammadi M, Al-Hosni I, Al-Mahmooli I and Al-Ghaithi A. 2013. Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease* 97(10):1363-1369.

- Alvarez, M. 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. Fitofilo 71: 169 p.
- Alves A, Crous P, Correia A and Phillips A. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Diversity 28:1-13.
- Alvidrez-Villarreal R, Hernández-Castillo F, Garcia-Martínez O, Mendoza-Villarreal R, Rodríguez-Herrera R and Aguilar C. 2012. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. Agricultural Sciences 3:405-416.
- Barbosa-Martínez C, León-García L, Sepúlveda-Sánchez J and Nieto-Angel D. 2002. Effects of ozone, iodine and chlorine on spore germination of fungi isolated from mango fruits. Revista Mexicana de Fitopatología 20(1): 60-65.
- Bautista-Baños S, Díaz-Pérez JC and Barrera-Necha L. 2002. Postharvest fungal rots of sapote mamey *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. More & Stearn. Postharvest Biology and Technology 24:197-200.
- Becerra L. 1995. Enfermedades del cultivo de mango. Pp:83-101. In: Mata B, Mosqueda V (eds.) La producción de mango en México. Editorial Limusa. México. 159 p.
- Begoude B, Slippers B, Wingfield M and Roux J. 2010. Characterization of *Botryosphaeriaceae* and *Cryphonectriaceae* associated with *Terminalia* spp. in Africa, PhD thesis, University of Pretoria. 268 p

- Burgess T, Barber P, Mohali S, Pegg G, de Beer W and Wingfield M. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423-435.
- Canales C. 1998. Tecnología para la producción temprana de mango. 1 ed. Comité Editorial del Campo Experimental Edzná. 12 p.
- Canales C. 2007. Control de la necrosis en frutos de marañón *Anacardium occidentale* en la península de Yucatán. Reporte anual de investigación e innovación tecnológica INIFAP. http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias_agricolas.php (consulta, mayo 2014).
- Cardoso J, Vidal J, dos Santos A, Freire F and Viana F. 2002. First report of branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *Plant Disease* 86(5):558.
- Crous P and Palm M. 1999. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia* 52:167-175.
- Crous P, Slippers B, Wingfield M, Rheeder J, Marasas W, Phillips A, Alves A, Burgess T, Barber P and Groenewald J. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology* 55:235-253.
- Damm U, Crous P and Fourie P. 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99:664-680.
- Da Silva A, Brainer R, Michereff S, da Silva M and Saraiva M. 2012. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 132:489-498.

- De los Santos de la R, Becerra L, Mosqueda V, Vásquez A y Vargas A. 2000. Manual de producción de papaya en el estado de Veracruz. Folleto Técnico No. 17. INIFAP–CIRGOC. Campo Experimental Cotaxtla. Veracruz, México. 67 p.
- Denman S, Crous P, Taylor J, Kang C, Pascoe I and Wingfield M. 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* 45:125-140.
- Gómez-Jaimes R, Nieto-Ángel D, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera J, Martínez-Damián M and Vargas-Hernández M. 2009. Evaluación de la calidad e incidencia de hongos en frutos refrigerados de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn. *Agrociencia* 43:37-48.
- Hawksworth D, Crous P, Redhead S, Reynolds D, Samson R, Seifert K, Taylor J, Wingfield M, Abaci O, Aime C, Asan A, *et al.* 2011. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2:105-112.
- Hernández A. 2010. Caracterización cualitativa de frutos de rambután (*Nephelium lappaceum* L.) almacenamiento postcosecha y patógenos asociados. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 50 p.
- Hernández F, Gómez J y Andrés A. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, INIFAP. Libro Técnico No. 1. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 87 p.

- Ismail A, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous P, Groenewald J and Lombard L. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology* 41:649-660.
- Johnson G, Mead A, Cooke A and Dean J. 1992. Mango stem end rot pathogens. Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology* 120:225-234.
- Khazada M, Lodhi A and Shahzad S. 2005. Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. *Pakistan Journal of Botany* 37:1023-1030.
- Kirk P, Stalpers J, Braun U, Crous P, Hansen K, Hawksworth D, Hyde K, Lücking R, Lumbsch T, Rosman A, Seifert K and Stadler M. 2013. A without-prejudice list of generic names of fungi for protection under the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants. *IMA Fungus* 4(2):381-443.
- Li H, Cao R and Mu Y. 1995. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection* 14:187-191.
- Liu A, Chen W and Li X. 2005. Changes in the postharvest physiology and lychee fruits latently infected by anthracnose fungus and the biological characteristic of the pathogenic fungus of the disease. *Acta Horticulturae* 665:365-371.
- Liu J, Phookamsak R, Doilom M, Wikee S, Li Y, Ariyawansa H, Boonme S, Chomnunti P, Dai D, Bhat J, Romero AI, Zhuang W, Monkai J, Jones E,

- Chukeatirote E, Ko K, Zhao Y, Wang Y and Hyde K. 2012. Towards a natural classification of Botryosphaerales. *Fungal Diversity* 57:149-210.
- Lutchmeah R. 1988. *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of *Annona muricata* in Mauritius. *Plant Pathology* 37:152.
- Marques M, Lima N, Morais M, Barbosa M, Souza B, Michereff S, Phillips J and Câmara M. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61:181-193.
- Martínez S. 2010. Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados. Montecillo, Estado de México. 88 p.
- Maslen M, Collis T and Stuart R. 1996. *Lasiodiplodia theobromae* isolated from subcutaneous abscess in a Cambodian immigrant to Australia. *Journal of Medical & Veterinary Mycology* 34:279-283.
- Mohali S, Burgess T and Wingfield M. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35:385-396.
- Mosqueda V, De los Santos R, Becerra L, Cabrera M, Ortega Z y del Angel P. 1996. Manual para cultivar mango en la planicie costera del Golfo de México. Campo Experimental Cotaxtla. INIFAP-CIRGOC. Folleto Técnico No. 15. Veracruz, México. 130 p.
- Netto M, Assuncao I, Lima G, Marques M, Lima W, Monteiro J, de Queiroz B, Michereff S, Phillips A and Camara M. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4> (Consulta, febrero 2014).

- Ochoa-Ascencio S, Vázquez M and Farías R. 2007. Identificación genético molecular de hongos asociados a la pudrición peduncular del fruto de aguacate en Michoacán, México. Memorias X Congreso Internacional/ XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Abs.
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho T, Gryzenhout M and Wingfield M. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50:313-322.
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho T and Wingfield M. 2009. Molecular and phenotypic characterization of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Mycologia* 101:636–647.
- Pegg K, Coates L, Korsten L and Harding R. 2003. Foliar, fruits and soilborne diseases. p. 299-337. In A. W. Whitley AW, Schaffer B and Wolstenholme BN (eds.). *The Avocado: Botany, Production, and Uses*. CABI Publishing, UK. 560 p
- Perera E, Lago E. 1986. Effect of the light period on mycelial growth and pycnidia formation of *Diplodia natalensis* (Abstr.). *Ciencias de la Agricultura* 26:14-18
- Phillips A, Alves A, Pennycook S, Johnston P, Ramaley A, Akulov A and Crous P. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21:29-55.

- Phillips A, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield M, Groenewald J and Crous P. 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51-167.
- Pitt J and Hocking A. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3 ed. Springer. pp 125-127.
- Ploetz RC. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp 76-77.
- Queiroz F, Muniz M and Menezes M. 1997. Podridão da haste do mamoeiro 'Sunrise Solo' causada por *Botryodiplodia theobromae* no Estado de Alagoas. *Summa Phytopathologica* 23(1):44-45.
- Rebell G and Forster R. 1976. *Lasiodiplodia theobromae* as a cause keratomycoses. *Sabouraudia* 14:155-170.
- Rico A. 2011. Próximos cambios en la nomenclatura de algas, hongos y plantas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 46(3-4):381-385.
- Rojó B. 2013. *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum capsici* asociadas a pudrición del pedúnculo y antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Culiacán, Culiacán, Sinaloa. 69 p.
- Romero C. 1993. *Hongos Fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo 333 p.
- Rubini M, Silva-Ribeiro R, Pomella A, Maki C, Araujo W, dos Santos D and Azevedo L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*,

causal agent of witches' broom disease. International Journal of Biological Sciences 1:24-33.

Saha A, Mandal P, Dasgupta S and Saha D. 2008. Influence of culture media and environmental factors of mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. Journal of Environmental Biology 29:407-410.

Sakalidis M, Ray J, Lanoiselet V, Hardy G and Burgess T. 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. European Journal of Plant Pathology 130:379-391.

Sandoval-Sánchez M, Nieto-Ángel D, Sandoval-Islas J, Téliz-Ortiz D, Orozco-Santos M, y Silva-Rojas H. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). Agrociencia 47:61-73.

Schoch C, Shoemaker R, Seifert K, Hambleton S, Spatafora JW and Crous PW. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. Mycologia 98:1041-1052.

Serrato-Díaz L, Rivera-Vargas L, Goenaga R and French-Monar R. 2014. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing inflorescence blight and fruit rot of longan (*Dimocarpus longan* L.) in Puerto Rico. Plant Disease 98:279.

Shah M, Verma K, Singh K and Kaur R. 2010. Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. Genetics and Molecular Research 9(2):1217-1228.

- Shahbaz M, Iqbal Z, Sallem A and Anjum M. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). Pakistan Journal of Botany 41:359-368.
- Sivakumar D, Wijeratnam R, Wijesundera R and Abeysekera M. 1997. Post-harvest diseases of rambutan (*Nephelium lappaceum*) in the western province. Journal of the National Science Council of Sri Lanka 25:225-229.
- Slippers B, Crous P, Denman S, Coutinho T, Wingfield B and Wingfield M. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia 96:83-101.
- Slippers B, Burgess T, Pavlic D, Ahumada R, Maleme H, Mohali S, Rodas C and Wingfield M. 2009. A diverse assemblage of Botryosphaeriaceae infect *Eucalyptus* in native and non-native environments. Southern Forests 71:101-110.
- Slippers B, Boissin E, Phillips AJL, Groenewald JZ, Lombard L, Wingfield MJ, Postma A, Burgess T and Crous PW. 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. Studies in Mycology 76:31-49.
- Summerbell R, Kraiden S, Levine R and Fuksa M. 2004. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. Medical Mycology 42:543-547.
- Tamayo PJ. 2007. Enfermedades del aguacate. Politécnica 4:51-70.

- Tovar P, Mora A, Nava D, Téliz O, Villegas M y Leyva M. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn] grafts in Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36: 233-238.
- Tucuch C, Palacios P, Ku N and Guzmán E. 2005. Manejo del cultivo de mango en el estado de Campeche. Campo Experimental Edzna, INIFAP. Folleto Técnico. Campeche, Camp., México. 33-34p.
- Umezurike G. 1979. The cellulolytic enzymes of *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Biochemistry Journal* 177:9-19.
- Úrbez-Torres J, Leavitt G, Guerrero J, Guevara J and Gubler W. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92:519-529.
- van Niekerk J, Crous P, Groenewald J, Fourie P and Halleen F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96:781-798.
- Varela F, Orozco S, Torres A and Silva A. 2013. Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas 428 p.
- Vásquez-López A, Mora-Aguilera JA, Cárdenas-Soriano E y Téliz-Ortiz D. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn] en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43:717-728.
- Ventura J, Costa H and Tatagiba J. 2004. Papaya diseases and integrated control. p. 201-268. *In*: Naqvi SAMH (ed.). *Diseases of Fruits and*

Vegetables: Diagnosis and Management. Volume II. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, United States of America. 704 p

Wang F, Zhao L, Li G, Huang J and Hsiang T. 2011. Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, Central China. *Plant Disease* 95:1378-1384.

Wijayawardene N, Crous PW, Kirk P, Hawksworth D, Dai D, Boehm E, Boonmee S, Braun U, Chommunti P, D'Souza M, *et al.* 2014. Naming and outline of Dothideomycetes-2014. www.fungaltaxonomy.org/files/6813/9241/1345/Naming_and_Outline_of_Dotheidomycetes_2014.pdf (consulta, mayo 2014)

Woo P, Lau S, Ngan A, Tse H, Tung E and Yuen K. 2008. *Lasiodiplodia theobromae* pneumonia in a liver transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology* 46(1):380-384.

Zhou S and Stanosz GR. 2001. Relationships among *Botryosphaeria* species and associated anamorphic fungi inferred from the analysis of ITS and 5.8S rDNA sequences. *Mycologia* 93:516-527.

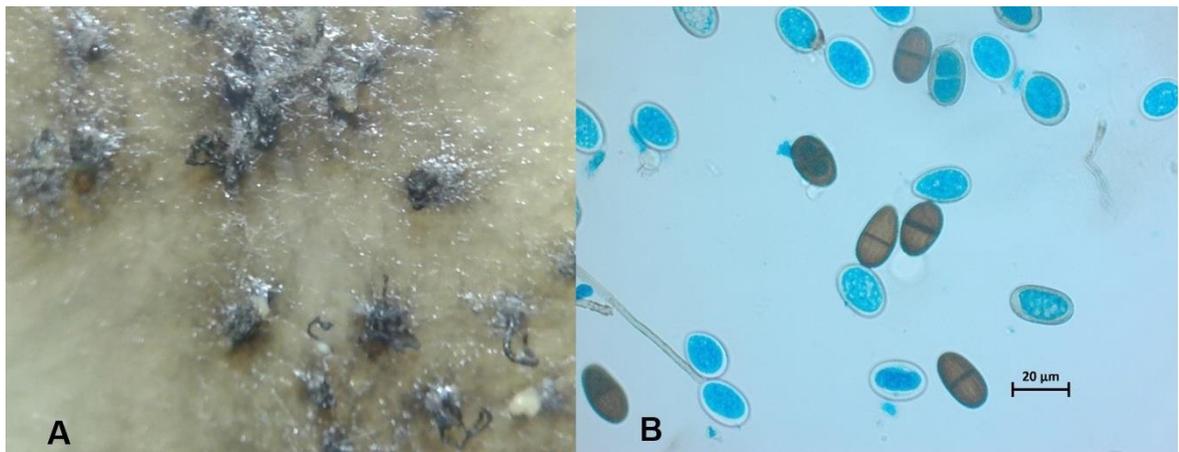


Figura 2. Estructuras de *Lasiodiplodia theobromae* en aislado proveniente de papaya. A) Micelio y picnidios en PDA a 14 días de crecimiento. B) Conidios maduros e inmaduros a 14 días de crecimiento.

Cuadro 1. Reportes en México de *L. theobromae* afectando distintos cultivos frutícolas y maderables.

HOSPEDERO	ENFERMEDAD	No. DE ACCESO NCBI	REFERENCIA
<i>Anacardium occidentale</i>	Necrosis de frutos	NR	Canales, 2007
<i>Anona spp.</i>	Muerte descendente de ramas Pudrición del fruto	NR	Hernández <i>et al.</i> , 2013
<i>Carica papaya</i>	Pudrición de frutos Pudrición del pedúnculo	NR KC335157 KC335158 KC806060 KC806061 KC806062	Mosqueda <i>et al.</i> , 1996 Rojo, 2013
<i>Carya illinoensis</i>	Pudrición del fruto	NR	Alvidrez-Villareal <i>et al.</i> , 2012
<i>Citrus aurantium L.</i>	Muerte de plantas	NR	Varela <i>et al.</i> , 2013
<i>Citrus aurantifolia</i>	Muerte de ramas	NR	Varela <i>et al.</i> , 2013
<i>Citrus sinensis</i>	Pudrición de la base del pedúnculo	NR	Varela <i>et al.</i> , 2013
<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>	Manchado de cáliz	NR	Martínez, 2010
<i>Mangifera indica</i>	Cáncer de troncos y ramas Muerte descendente Pudrición del pedúnculo	NR NR NR NR JQ619648 JQ619649 JQ619650 JQ619651	Canales, 1998 Becerra, 1995 Mosqueda <i>et al.</i> , 1996 Tucuch <i>et al.</i> , 2005 Sandoval-Sánchez <i>et al.</i> , 2013
<i>Nephelium lappaceum L.</i>	Pudrición de frutos	FJ478102.1	Hernández, 2010
<i>Persea americana</i>	Pudrición del pedúnculo	NR	Ochoa-Ascencio <i>et al.</i> , 2007
<i>Pinus pseudostrabus</i>	Cáncer de tallo	NR	Mohali <i>et al.</i> , 2005
<i>Pinus sp.</i>	Cáncer de tallo	AY236952	Slippers <i>et al.</i> , 2004
<i>Pouteria sapota</i>	Muerte descendente Pudrición de frutos	JQ245975	Bautista-Baños <i>et al.</i> , 2002 Gómez-Jaimes <i>et al.</i> , 2009 Vázquez-López <i>et al.</i> , 2009
<i>Theobroma cacao</i>	Pudrición de la mazorca	NR	Álvarez, 1976
<i>Vitis vinifera</i>	Muerte descendente	EU012363	Úrbez-Torres <i>et al.</i> , 2008

NR= No reportado

CAPÍTULO IV. ARTÍCULO CIENTÍFICO

Especies de *Lasiodiplodia* Causantes de Pudrición del Pedúnculo en Frutos de Papaya en México

Lasiodiplodia Species Causing Stem-End Rot on Papaya Fruits in Mexico

Paola Alejandra Picos-Muñoz, Josefa Adriana Sañudo-Barajas, Josefina León-Félix, Raymundo Saúl García-Estrada, Raúl Allende-Molar.* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Culiacán. Carr. a Eldorado Km 5.5. Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa. CP 80110, México. (paola.picos@ciad.mx, adriana@ciad.mx, ljosefina@ciad.mx, rsgarcia@ciad.mx, rallende@ciad.mx)

*Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx

Resumen

México es el principal país exportador de frutos de papaya en el mundo. Durante un estudio realizado en las principales zonas productoras de papaya, se colectaron frutos con síntomas de pudrición del pedúnculo para identificar los hongos responsables de la enfermedad. Con base en las características morfológicas, el análisis de las secuencias nucleotídicas de las regiones espaciadoras transcribibles internas (ITS1-5.8S-ITS2) y un fragmento del gen que codifica para el factor de elongación 1- α (EF- α), se identificó a *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* como los agentes causales de la pudrición del pedúnculo. Este es el primer reporte de *L. pseudotheobromae* ocasionando la pudrición del pedúnculo en frutos de *Carica papaya* L. en México.

Palabras Clave Adicionales

Lasiodiplodia pseudotheobromae, *Lasiodiplodia theobromae*, pudrición del pedúnculo, *Carica papaya*.

Abstract

Mexico is the main exporter country worldwide of papaya fruit. During a survey conducted in the main papaya producing areas in Mexico, papaya fruits with stem-end rot symptoms were collected in order to identify the causal agents of the disease. Based on cultural and morphological characteristics and analyses of nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) and a fragment of the translation elongation factor 1- α (EF- α), the pathogen was identified as *Lasiodiplodia theobromae* and *L. pseudotheobromae*. To our knowledge, this is the first report of *L. pseudotheobromae* causing stem-end rot in *Carica papaya* L. in Mexico.

Additional Keywords

Lasiodiplodia theobromae, *L. pseudotheobromae*, stem end rot, *Carica papaya*.

La papaya es un fruto que se exporta al mercado internacional, principalmente por su consumo en fresco, aunque en años recientes se ha incrementado su uso industrial (Evans y Ballen, 2012). En México, la papaya se cultiva en una superficie de aproximadamente 17,000 ha (SIAP, 2016). Sin embargo, la enfermedad conocida como pudrición del pedúnculo, la cual es causada por el hongo *Lasiodiplodia theobromae*, ha incrementado su presencia ocasionando

daños y pérdidas en la producción de este fruto (Rahman *et al.*, 2008; Bautista-Baños *et al.*, 2013). La enfermedad se presenta principalmente en frutos poscosecha, en los cuales se observan lesiones de tipo acuosas que pueden aparecer en cualquier parte del fruto, principalmente en la zona del pedúnculo, las cuales en un inicio son pequeñas, posteriormente se agrandan y se tornan de color negro, y finalmente se cubren de picnidios (Perseley y Ploetz, 2003).

Las especies del género *Lasiodiplodia* son patógenos importantes de distintas plantas, especialmente en regiones tropicales y subtropicales. Más de 20 especies en el género *Lasiodiplodia* se han descrito desde el inicio de este siglo (Pavlic *et al.*, 2004), cuya identificación y diferenciación se basa en la morfología de sus conidios y secuencias nucleotídicas de ciertas regiones de ADN como ITS (espaciador transcribible interno), EF 1- α (factor de elongación uno alfa) y Bt (Beta tubulina). *Lasiodiplodia theobromae* forma parte de un complejo de especies crípticas distinguibles entre sí solamente por diferencias en las secuencias de gen EF 1- α y Bt (Alves *et al.*, 2008; Phillips *et al.*, 2013).

En México, solamente *L. theobromae* ha sido reportada ocasionando pudrición del pedúnculo en papaya (Álvarez, 1976), y la mayoría de estos reportes han sido realizados considerando solo la morfología de esporas y características de las colonias, las cuales se consideran insuficientes para discriminar dentro de un complejo de especies crípticas (Phillips *et al.*, 2013). El objetivo de este estudio fue identificar las especies de *Lasiodiplodia* en aislados obtenidos de frutos de papaya con síntomas de pudrición del pedúnculo, con base en características morfológicas y análisis moleculares.

Metodología

Aislamiento y morfología. Frutos de papaya con los síntomas característicos de la pudrición del pedúnculo fueron colectados de huertos durante el periodo 2012-2014. Se tomaron piezas de tejido (5 mm) entre la parte sana y enferma, se sumergieron en 2 % de hipoclorito de sodio por 1 minuto y lavaron dos

veces con agua destilada estéril. Las piezas fueron colocadas en una placa con agar papa dextrosa (PDA) e incubadas a 27°C por cinco días. Las colonias del hongo fueron transferidas a placas con agar extracto de malta y después de la esporulación se obtuvieron cultivos monospóricos. Las características morfológicas (tamaño de conidio, forma, color, estriación, septación, picnidios) de los aislados fueron observados y medidos por microscopía óptica.

Identificación molecular. Se extrajo el ADN de 17 aislados monospóricos siguiendo el método descrito por Gupta *et al.* (2013), posteriormente la integridad del ADN se determinó mediante un análisis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con gel red y los resultados se visualizaron en un fotodocumentador GelDoc XR imaging system (Bio-Rad).

El ADN extraído se utilizó como plantilla en reacciones de amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores ITS1 e ITS4, EF1-728 y EF1-985R (White *et al.*, 1990; Phillips *et al.*, 2005). Las reacciones de PCR fueron en un volumen final de 25 µl: 8 µl agua esteril nanopura, 12 µl de 2X GoTaq MasterMix Buffer Promega (Promega, USA), 2 µl ADN, 1.5 µl de cada iniciador. La amplificación se efectuó en un termociclador T100 (Bio-Rad, USA). Los productos amplificados de PCR fueron purificados con el kit Wizard SV (Promega, USA) y enviados para su secuenciación en ambas direcciones (LANGEBIO), las secuencias obtenidas se alinearon en la base de datos del centro nacional para la información biotecnológica (NCBI). Una vez identificados se depositaron las secuencias en la base de datos GenBank del NCBI (Cuadro 2).

Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron para los conjuntos de datos de la región ITS y EF1- α con el método de máxima de parsimonia utilizando el software MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2007). El análisis fue el Close Neighbour Interchange (CNI) opción de búsqueda (nivel=3) con el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones), los espacios o datos faltantes fueron considerados deleciones totales. Para conocer los valores de confianza en los clados del árbol, se realizó un análisis bootstrap con 1000 repeticiones. Se

utilizaron secuencias depositadas en la base de datos del NCBI de *Lasiodiplodia egyptiaca*, *L. euphorbicola*, *L. hormozganensis*, *L. parva*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *L. theobromae* (Cuadro 2) para incluirlas como especies de referencia junto con las obtenidas en este estudio. *Diplodia seriata* (números de acceso AY259093 y AY573219) se designó como la especie fuera de grupo para la construcción del árbol evolutivo.

Pruebas de patogenicidad. Basados en la identificación de las especies, se tomaron tres aislados representativos de cada especie para evaluar la patogenicidad. A cada fruto se le hicieron incisiones en la zona ecuatorial con puntas de agujas estériles a una profundidad de 5 mm. Un disco de micelio (5 mm de diámetro) tomado de una colonia en crecimiento de cinco días de edad de cada aislado, fue colocado directamente en la herida del fruto. Como control se colocó de igual forma un disco de agar estéril sobre la herida producida en el fruto de papaya. Se consideró al aislado como patogénico si el área de infección era mayor a los 5 mm de diámetro a las 24 h posteriores de la inoculación inicial (Sakalidis *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico (prueba de Kruskal-Wallis) utilizando el programa Minitab 17 para determinar la virulencia de los aislados. El experimento se repitió 2 veces.

Resultados y Discusión

Patógenos identificados. El hongo *Lasiodiplodia* creció rápidamente en MEA, con un micelio inicialmente blanco tornándose negro a los tres días. Del total de los aislados, 14 se identificaron como *Lasiodiplodia theobromae* (6 de Colima, 6 de Oaxaca y 2 de Veracruz) y 3 como *L. pseudotheobromae* (2 de Veracruz y 1 de Oaxaca) con base en las características morfológicas y secuenciación de las regiones ITS y EF1- α . La morfología de *L. theobromae* se presentó con paráfisis hialinas, cilíndricas, septadas, conidias inicialmente hialinas y aseptadas, elipsoidales a ovoides, 9-14 x 18-27 μm (Figura 3a), con

contenido granular, tornándose cafes con un septo y estrías longitudinales. En *L. pseudotheobromae* se observaron paráfisis hialinas, cilíndricas, aseptadas, conidias inicialmente hialinas, aseptadas, elipsoidales a ovoides, 10-15 x 19-28 μm (Figura 3b), con contenido granular, tornándose cafes con un septo y estrías longitudinales al madurar.

Los productos amplificados con los oligonucleótidos ITS1 - ITS4 y EF1-728 - EF1-985R fueron de aproximadamente 550 pb y 380pb respectivamente, y al comparar las secuencias nucleotídicas en la base de datos del GenBank (NCBI) mostraron un 99 % de identidad con *L. theobromae* y *L. pseudotheobromae*, respectivamente. Esto se corroboró mediante el análisis filogenético, donde se agruparon los aislados pertenecientes a cada especie en grupos separados (Figura 4).

Lasiodiplodia pseudotheobromae es una especie críptica de *L. theobromae*, ya que su morfología es muy similar y solo se llegan a diferenciar por secuencias genéticas, por lo que seguramente por mucho tiempo fue confundida con esta última (Alves *et al.*, 2008). El único reporte de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* en México se documentó en el cultivo de mango en donde ocasiona muerte descendente de ramas y pudrición del pedúnculo en frutos (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013).

El análisis filogenético con las regiones combinadas de ITS y EF- α muestra una separación entre las dos especies, además agrupó a *L. theobromae* claramente distante de *L. pseudotheobromae*. Corroborando que las especies crípticas del género *Lasiodiplodia* solo pueden ser distinguidas por análisis filogenético de su ADN, morfología y dimensiones de las conidias y paráfisis (Alves *et al.*, 2008; Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

Patogenicidad de los aislados. Todos los aislados ocasionaron los síntomas característicos de la enfermedad después del primer día de inoculación. El diámetro promedio de la lesión fue de 39 mm para *L. theobromae* y de 41 mm para *L. pseudotheobromae*, a las 72 h después de la inoculación (Figura 5). No se observaron síntomas de la enfermedad en el fruto control.

La especie más virulenta, de acuerdo al tamaño de la lesión, en este estudio fue *L. pseudotheobromae*, lo cual coincide con Sakalidis *et al.* (2011) e Ismail *et al.* (2012) quienes observaron una mayor virulencia de esta especie en mango, y con Begoude *et al.* (2010) en *Terminalia* sp. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con los obtenidos por Netto *et al.* (2014), quienes la clasificaron como una especie con virulencia baja en papaya; por ello es necesario realizar estudios adicionales para determinar si la variabilidad en virulencia dentro de la misma especie está determinada por factores genéticos o ambientales.

El género *Lasiodiplodia* se conforma de aproximadamente 30 especies, de las cuales cinco se han reportado afectando el cultivo de papaya: *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. hormozganensis*, *L. marypalme* y *L. brasiliense* (Phillips *et al.*, 2013; Netto *et al.*, 2014). En México solamente *L. theobromae* se había documentado afectando papaya, por lo que son necesarios estudios adicionales relacionados con la patogénesis de *L. pseudotheobromae* para poder establecer a corto plazo medidas de prevención o control del patógeno.

Conclusiones

Este es el primer reporte de especies del género *Lasiodiplodia* asociadas al cultivo de papaya en México que integra características morfológicas, datos moleculares y patogenicidad. Los datos obtenidos pueden ser usados para mejorar las estrategias de control del patógeno.

Agradecimientos. Agradecimiento especial al proyecto SAGARPA-CONACYT 2011-163213 por el soporte financiero para la realización de esta investigación y al Conacyt por el financiamiento a los estudios de P.A. Picos-Muñoz.

Literatura Citada

- Abdollahzadeh J, Javadi A, Mohammadi Goltapeh E, Zare R, Phillips A. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10. <http://dx.doi.org/10.3767/003158510X524150>
- Álvarez M. 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71: 169 p.
- Alves A, Crous P, Correia A, Phillips A. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- Bautista-Baños S, Sivakumar D, Bello-Pérez A, Villanueva-Arce R, Hernandez-Lopez M. 2013. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection* 49:8-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>
- Begoude B. 2010. Characterization of *Botryosphaeriaceae* and *Cryphonectriaceae* associated with *Terminalia* spp. in Africa, PhD thesis, University of Pretoria. 268 p.
- Evans E, Ballen F. 2012. An overview of global papaya production, trade, and consumption. University of Florida, Tropical Research and Education Center, Homestead, Florida. Disponible en línea <http://edis.ifas.ufl.edu>
- Gupta V, Tuohy M, Ayyachamy M, O'Donovan A, Turner K. 2013. Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology. Springer. New York, USA. 604 p.

- Ismail A, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous P, Groenewald J, Lombard L. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. Australasian Plant Pathology 41:649-660. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-012-0163-1>
- Netto M, Assuacao I, Lima G, Marques M, Lima W, Monteiro J, Queiroz V, Michereff S, Phillips A, Camara M. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. Fungal Diversity 67:127-141. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4>
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho T, Gryzenhout M, Wingfield M. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. Studies in Mycology 50:313-322. Disponible en línea: http://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/657-2004_pavlic_slippers_coutinho_gryzenhout_wingfield_studies_mycol.pdf
- Perseley D, Ploetz R. 2003. Diseases of papaya. In: Ploetz, R.C. (ed) Diseases of tropical fruit crops. CABI, Cambridge, 373-412 pp. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993904.00>
- Phillips A, Alves A, Correia A, Luque J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia 97:513-529. Disponible en línea: <http://www.mycologia.org/content/97/2/513.full.pdf>
- Phillips A, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield M, Groenewald J, Crous P. 2013. The *Botryosphaeriaceae* genera and species known from culture. Studies in Mycology 76:51-167. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0021>

- Rahman M, Mahmud T, Kadir J, Rahman R, Begum M. 2008. Major postharvest fungal diseases of Papay cv. "Sekaki" in Sengalor, Malaysia. *Journal of Tropical Agricultural Science* 31:1-27. Disponible en línea: [http://pertanika.upm.edu.my/Pertanika%20PAPERS/JTAS%20Vol.%2031%20\(1\)%20Feb.%202008/07%20PAGE%2027-34.pdf](http://pertanika.upm.edu.my/Pertanika%20PAPERS/JTAS%20Vol.%2031%20(1)%20Feb.%202008/07%20PAGE%2027-34.pdf)
- Sakalidis M, Ray J, Lanoiselet V, Hardy G, Burgess T. 2011. Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 130:379-391. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-011-9760-z>
- Sandoval-Sánchez M, Nieto-Ángel D, Sandoval-Islas JS, Téliz-Ortiz D, Orozco-Santos M, Silva-Rojas H. 2013. Fungi associated to stem-end rot and dieback of mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47:61-73. Disponible en línea: http://www.sielo.php?script=sci_attext&pid=S140531952013000100006&lng=es&nrm=iso
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Atlas agroalimentario 2016. Primera edición. México, DF. 231 pp.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, FilipSKI A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (ed) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. San Diego: Academic.

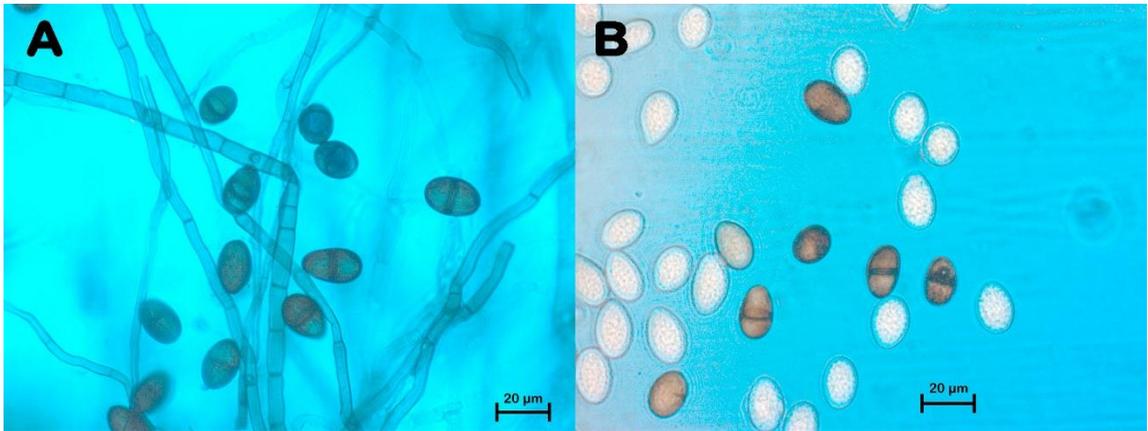


Figura 3. Morfología de *Lasiodiplodia* en frutos de *Carica papaya*. a. Masa de conidios de *L. theobromae* aislado BOM108 a 40x. b. Masa de conidios de *L. pseudotheobromae* aislado BOM240 a 40x.

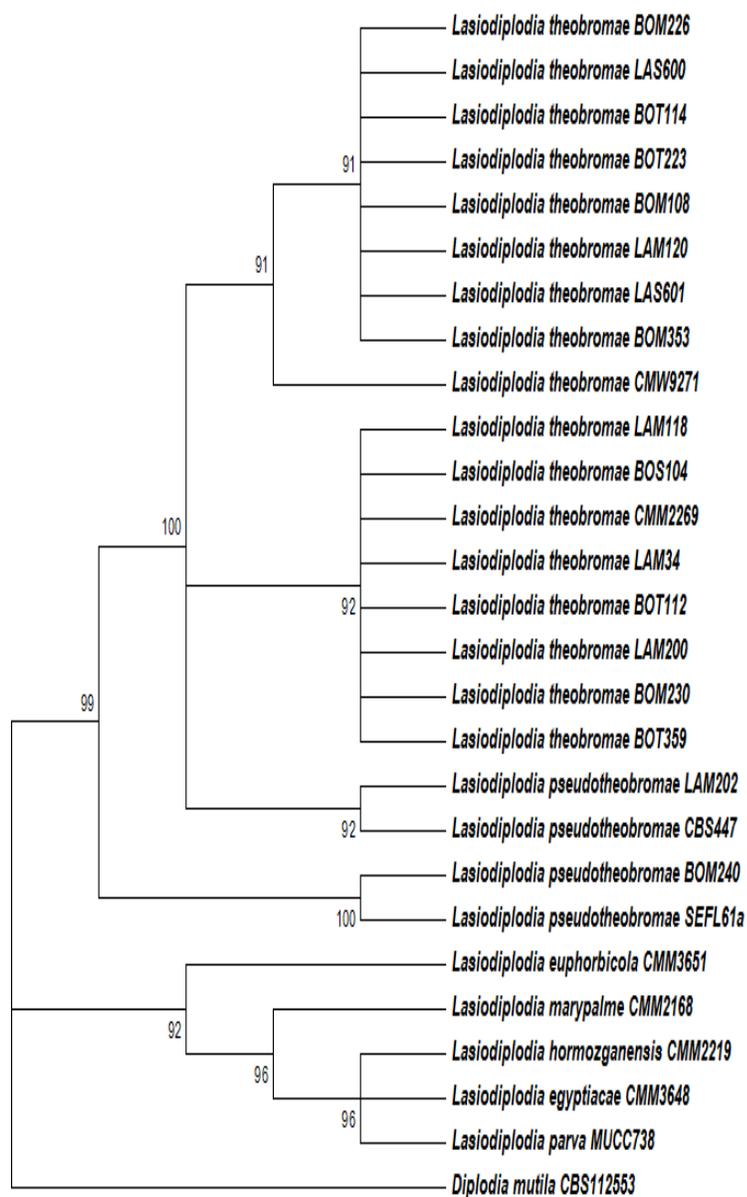


Figura 4. Árbol consenso obtenido de las secuencias ITS/EF de *Lasiodiplodia* (longitud=190; índice de consistencia=0.953015; índice de retención=0.9735, 1000 réplicas).

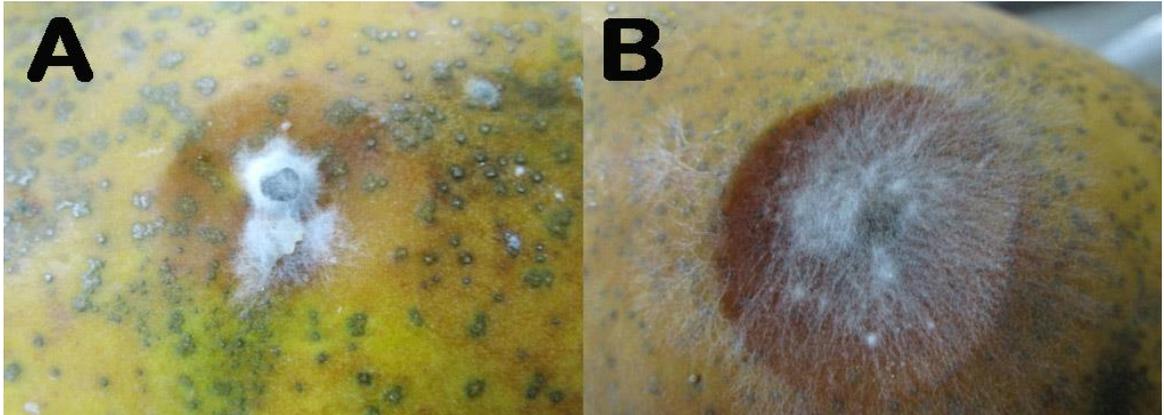


Figura 5. Patogenicidad en frutos de *Carica papaya*. a. Fruto inoculado con *L. theobromae* después de 72 h de la inoculación. b. Fruto inoculado con *L. pseudotheobromae* después de 72 h de la inoculación.

Cuadro 2. Aislados de *Lasiodiplodia* usados en este estudio

Especie	Aislado	Hospedero	Origen	Número de Acceso en GenBank	
				ITS	EF-1 α
<i>Diplodia seriata</i>	CBS11255 ¹	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	AY259093*	AY573219*
<i>Lasiodiplodia egyptiaca</i>	CMM3648	<i>Carica Papaya</i>	Brasil	KF234549*	KF226705*
<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>	CMM3651	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234553*	KF226711*
<i>Lasiodiplodia hormozganensis</i>	CMM2219	<i>Carica papaya</i>	Brasil	KC484834*	KC481558*
<i>Lasiodiplodia parva</i>	MUCC738	<i>Adansonia digitata</i>	Australia	GU199408*	HM355855*
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	SEFL61a	<i>Vaccinium spp.</i>	USA	JN607094*	JN607117*
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CBS447	<i>Citrus aurantium</i>	Surinam	EF622081*	EF622060*
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	BOM240	<i>Carica papaya</i>	Mexico	KP212096	KP212098
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	LAM202	<i>Carica papaya</i>	México	KT075144	KP212060
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	BOT359	<i>Carica papaya</i>	México	KR001859	KT075159
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	CMM2269	<i>Carica papaya</i>	Brasil	KV484821*	KC481585*
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CMW9721	<i>Schizolobium parahyba</i>	Ecuador	KF886708*	KF886731*
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BOM108	<i>Carica papaya</i>	México	KR001854	KT075146
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BOM226	<i>Carica papaya</i>	México	KR001855	KT075147
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BOM230	<i>Carica papaya</i>	México	KR001856	KT075130
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BOM353	<i>Carica papaya</i>	México	KT075138	KT075149
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BOS104	<i>Carica papaya</i>	México	KR001857	KT075158
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BOT112	<i>Carica papaya</i>	México	KT075139	KT075155

Especie	Aislado	Hospedero	Origen	Número de Acceso en GenBank	
				ITS	EF-1 α
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BOT114	<i>Carica papaya</i>	México	KT075140	KT075150
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	BOT223	<i>Carica papaya</i>	México	KR001858	KT075148
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	LAM118	<i>Carica papaya</i>	México	KT075141	KT075156
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	LAM120	<i>Carica papaya</i>	México	KT075142	KT075151
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	LAM134	<i>Carica papaya</i>	México	KR180059	KT075153
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	LAM200	<i>Carica papaya</i>	México	KX355576	KT075157
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	LAS600	<i>Carica papaya</i>	México	KT075143	KT075152
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	LAS601	<i>Carica papaya</i>	México	KR001861	KT075145

1) Acrónimos de las colecciones de cultivos: CBS– Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CMM-Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes”, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil; MUCC- Murdoch University Culture Collection, Murdoch, Australia, YCL- Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Hainan, China; BOM, BOS, BOT, LAS, LAM Cepario del Laboratorio de Fitopatología CIAD A.C.

*) Números de acceso de secuencias con asterisco obtenidas de GenBank. El resto obtenidas en el presente estudio.

CAPÍTULO V. ARTÍCULO CIENTÍFICO

Variabilidad Genética de *Lasiodiplodia theobromae* Responsable de la Pudrición del Pedúnculo de Papaya en México.

Paola Alejandra Picos-Muñoz, Raymundo Saúl García-Estrada, Josefina León-Félix, Josefa Adriana Sañudo-Barajas and Raul Allende-Molar.
Research Center for Food and Development, Sinaloa, Mexico. Carr. a Eldorado Km 5.5 Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, CP 80110.

Autor de correspondencia: R. Allende-Molar

Correo electrónico: rallende@ciad.mx

Resumen

El agente causal de la pudrición del pedúnculo en el fruto de papaya es *Lasiodiplodia theobromae*. Se determinó la variabilidad genética de 25 aislados de este hongo, obtenidos de *Carica papaya* en México en los estados de Colima, Oaxaca y Veracruz, para la cual se utilizaron como marcadores genéticos, las secuencias simples repetidas (SSR). Para el análisis de grupos se usó el método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada (UPGMA), obteniéndose dos grupos distintos. La diferenciación genética indica moderados niveles de diversidad entre las poblaciones de *L.*

theobromae. Se encontró una relación geográfica entre el origen geográfico de los aislados, la vertiente del golfo de México y la del Océano Pacífico.

Palabras Clave

Carica papaya; *Lasiodiplodia theobromae*; Diversidad genética; Secuencias simples repetidas; SSR;

Introducción

El género *Lasiodiplodia* es un hongo cosmopolita que causa enfermedades en muchas plantas de importancia comercial como el mango (Johnson, 1992), aguacate (Pegg *et al.*, 2003), uvas (van Niekerk *et al.*, 2004), cítricos (Damn *et al.*, 2007), papaya (Queiroz *et al.*, 1997) entre otros, ocasionando pérdidas económicas durante la producción. En papaya causa la pudrición del pedúnculo, cuyos síntomas empiezan durante la maduración del fruto, en un inicio se observan lesiones pequeñas y difusas, con un exudado café, posteriormente se tornan de color negro y llegan a medir 4 cm de diámetro. Los márgenes de las lesiones son translucidos y se van cubriendo por hifas y picnidios del patógeno (Ploetz, 2003).

Uno de los marcadores genéticos más utilizados en estudios de diversidad genética, son las Secuencias Simples Repetidas (SSR), las cuales realizan una caracterización de la población, el flujo de genes y evidencia de especiación en muchos hongos patógenos (Fernández *et al.*, 2002). Los SSR han sido usados para examinar el flujo genético en *L. theobromae* (Nielsen *et al.*, 2011). Se ha propuesto que existen barreras geográficas para el

intercambio de genes entre poblaciones, como es el caso de la investigación de Burgess *et al.* (2003) con *L. theobromae* provenientes de Venezuela, México y Sudáfrica en donde se consideró al Océano Atlántico como la principal barrera geográfica entre los continentes y la orografía como la barrera interna en los países. Shah *et al.* (2010) analizaron 30 aislados de *L. theobromae* obtenidos de peras, encontrando una alta diversidad genética entre las zonas de colecta y una baja diversidad para los aislados de la misma zona. Otros estudios de diversidad proponen que dos especies crípticas de *Lasiodiplodia* (*L. theobromae* y *L. pseudotheobromae*) no han sido estudiadas en el mismo *hospedero* y no se ha establecido si en algún momento ocurrió una hibridación entre estas (Begoude *et al.*, 2010). En México son pocos los reportes de diversidad genética de *L. theobromae*, por lo que el objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad genética entre poblaciones estudiadas de *L. theobromae* aisladas del fruto de papaya en México.

Metodología

Aislamiento del hongo. Un total de 25 aislados de *L. theobromae* fueron analizados en el presente estudio, de los cuales 10 provenían de Colima, 10 de Oaxaca y 5 de Veracruz. Se aislaron de frutos de papaya con síntomas característicos de la pudrición del pedúnculo. Para el aislamiento primario, se desinfectaron muestras de tejido, con Tween 80, y colocadas en agar extracto de malta (MEA) a 25 °C, posteriormente se hicieron cultivos monospóricos de cada aislado y se preservaron en tubos con MEA.

Extracción de ADN y SSR-PCR. Se cultivó el hongo en caldo papa-dextrosa en agitación continua a 120 rpm por 72 horas. El ADN fue extraído a partir del micelio siguiendo el protocolo de Gupta *et al.* (2013). La concentración de ADN fue estimada en 1% (p/v) de gel de agarosa conteniendo redgel a 0.1 µg/mL en 0.5 X TAE amortiguador (0.4 M, 0.5 acetato de sodio y 0.01 M EDTA, pH 7) y la visualización fue en luz UV. El ADN se almacenó a -20 °C. Los oligonucleótidos SSR (Cuadro 3) fueron usados para la huella genética de los aislados de *L. theobromae*.

Se prepararon 20 µL de reacción en tubos de 0.2 mL para PCR, conteniendo 2.0 µL de ADN, 1 µL de cada primer, 6 µL de agua y 10 µL de 2X GoTaq MasterMix Buffer Promega (Taq polimerasa, dNTP's, MgCl). Para la amplificación en el termociclador, se programó con una desnaturalización inicial a 95 °C por 2 minutos seguida de 35 ciclos de 95 °C de 30 s, alineación de oligonucleótidos de 51-68 °C (dependiendo de los iniciadores a usar) por 30 s, extensión de 72 °C por 35 s (10 ciclos) y 45 s (25 ciclos) y una extensión final de 72 °C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron observados en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en 0.5 amortiguador TAE, teñido con redgel, el marcador molecular que se utilizó fue de 100 pb. Los geles se corrieron a 5 V/cm por 2 h y visualizados en luz UV en un fotodocumentador GelDoc XR imaging system (Bio-Rad).

Análisis de datos. Los datos generados a partir de los marcadores SSR se convirtieron a una matriz binaria, donde 1 indicaba visualización del producto y 0 ausencia del mismo. El número y porcentaje de loci polimórficos y diversidad genética de Nei fue determinado para cada población. Se utilizó el programa POPGENE (v 1.32) para determinar la diversidad y distancia genética de Nei. Un dendrograma basado en las medias de la diversidad genética de Nei fue construido a partir del método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada (UPGMA). El método estadístico utilizado fue el coeficiente de Sorensen-Dice.

Resultados

Huella genética de *Lasiodiplodia theobromae*. Se obtuvieron, en base en la amplificación de los marcadores SSR, un rango de 2 a 4 bandas con un total de 27 bandas de 0.2 a 0.8 kb. Se muestra el patrón de bandas obtenidas por los oligonucleótidos LAS5and6, con 13 aislados en la Figura 6. Con este marcador se obtuvieron bandas monomórficas en diferentes aislados, en un rango de 0.2 – 0.6 kb.

Relación filogenética entre los aislados de *Lasiodiplodia theobromae*. El análisis de UPGMA identificó dos grupos (Fig. 7) de acuerdo con las medias de Nei, el porcentaje fue de 98% para el grupo I. Este grupo contiene una combinación de aislados provenientes de Colima y Oaxaca, indicando así que los genotipos se agrupan de acuerdo al origen geográfico de los mismos. El otro grupo fue el de Veracruz en la costa del Golfo de México.

Diversidad genética. En general el nivel de diversidad genética de las tres poblaciones fue de 0.329, donde para Colima se obtuvo 0.344 y en Oaxaca 0.304 indicando niveles moderados, comparados con un bajo nivel obtenido en Veracruz de 0.114.

Discusión

La diferenciación genética refiere niveles moderados entre los aislados, de acuerdo a lo obtenido con la UPGM, formando dos grupos en base al origen geográfico. Esto puede implicar el movimiento del patógeno a través de los estados costeros más no entre las vertientes del Golfo de México y del Océano Pacífico.

La caracterización molecular del grupo de aislados de *L. theobromae* analizado mostró un alto nivel de similitud entre los aislados de Colima y Oaxaca, formando un solo grupo. Resultados diferentes se obtuvieron por

Mohali *et al.* (2005) quienes obtuvieron una baja diversidad genética entre las poblaciones de *L. theobromae* de árboles maderables de México, Venezuela y Sudáfrica, y una alta diversidad entre los aislados de acuerdo al hospedero (*Pinus* spp. y *Eucalyptus* spp.), atribuyéndolo a una posible adaptación del patógeno al huésped. Otros estudios realizados entre poblaciones de *L. theobromae* de distintos orígenes geográficos indican niveles moderados de acuerdo al origen geográfico y niveles altos de acuerdo al hospedero *Theobroma cacao* en Cameron (0.48) *Pinus* (0.63), *Eucalyptus* (0.67) y *Acacia* (0.51) en Venezuela (Mohali *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2006).

Agradecimientos

Agradecimiento al Proyecto 2011-163213 de SAGARPA-CONACYT por el apoyo financiero para esta investigación. Al Conacyt por el apoyo financiero a los estudios de P.A. Picos-Muñoz. Al Dr. JM Pech-Canché por la revisión crítica del manuscrito.

Literatura Citada

Begoude B, Slippers B, Wingfield M and Roux J. 2010. Characterization of *Botryosphaeriaceae* and *Cryphonectriaceae* associated with *Terminalia* spp. in Africa, PhD thesis, University of Pretoria. 116-188 pps

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

- Damm U, Crous P and Fourie P. 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodiaplurivora* sp. nov. *Mycologia* 99:664-680.
- Fernandez M, Figueiras A and Benito C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 845-851.
- Gupta V, Tuohy M, Ayyachamy M, O'Donovan A, Turner K. 2013. *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*. LAP Ag & Co, Germany.
- Johnson G, Mead A, Cooke A and Dean J. 1992. Mango stem end rot pathogens. Fruit infection by endophytic colonization of the inflorescence and pedicel. *Annals Applied Biology* 120:225-234.
- Mohali S, Burgess T and Wingfield M. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology* 35:385-396.
- Nielsen R, Paul J, Albrechtsen A and Song Y. 2011. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature Reviews Genetics* 12:6:443-451.
- Pegg K, Coates L, Korsten L and Harding R. 2003. Foliar, fruits and soilborne diseases. p. 299-337. *In* A. W. Whitley AW, Schaffer B and Wolstenholme BN (eds.). *The Avocado: Botany, Production, and Uses*. CABI Publishing, UK. 560 p.

- Ploetz R. 2003. Diseases of Tropical Fruit Crops. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp 76-77.
- Queiroz F, Muniz M and Menezes M. 1997. Podridão da haste do mamoeiro 'Sunrise Solo' causada por *Botryodiplodia theobromae* no Estado de Alagoas. Summa Phytopathologica 23(1):44-45.
- Shah M, Verma K, Singh K and Kaur R. 2010. Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriace) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India. Genetics Molecular Research 9(2)1217-1228.
- van Niekerk J, Crous P, Groenewald J, Fourie P and Halleen F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. Mycologia 96:781-798.

Cuadro 3. Oligonucleótidos SSR usados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia de Oligonucleótidos	Temperatura de alineamiento
BOT 3&4	F: 5'GACTCATTACGGTCTCATGG R: 5'GTGGAGCGGAACTGTCTGCT	58° C
LAS 13&14	F 5'GAGTTGTTAGTGCGGGCGCC R: 5'GCAGCCCCACAATTCACCAG	58° C
LAS 15&16	F: 5'-GCCAGATCCGTGCCCACTG R: 5'CATGCAGAGGTCGCAAAGTG	58° C
LAS 21&22	F: 5'GGAAGATGATGGGATGGTTGC R: 5'GTACAAGAACGAACTCCGGGT	58° C
LAS 27&28	F: 5'CGAACAGGGTTTCGTGACGT R: 5'CTCATATCTCGCCGGTTGCC	57° C
BOT 35&36	F: 5'-CTCCATCCTGATCCAGGGTCC R: 5'GACGAATCAAGCGGGCTGCCC	56° C
BOT 37&38	F: 5'GGTACTCGACGATGATCTCC R: 5'CAGTCACTTACCACGACACC	57° C

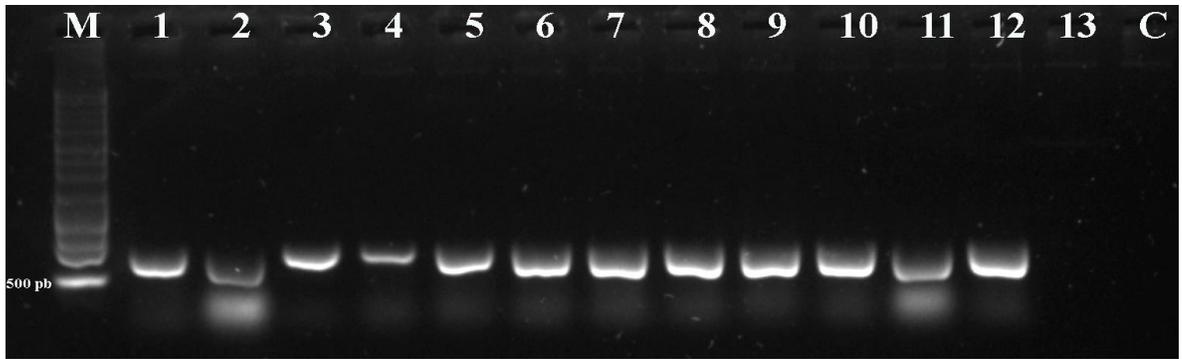


Figura 6. Amplificación de 13 aislados de *L. theobromae* usando los marcadores LAS5and6 (SSR). M= marcador ADN; C= control negativo; líneas 1 a 5= aislados de colima; líneas 6 a 10= aislados de Oaxaca; líneas 11 a 13= aislados de Veracruz.

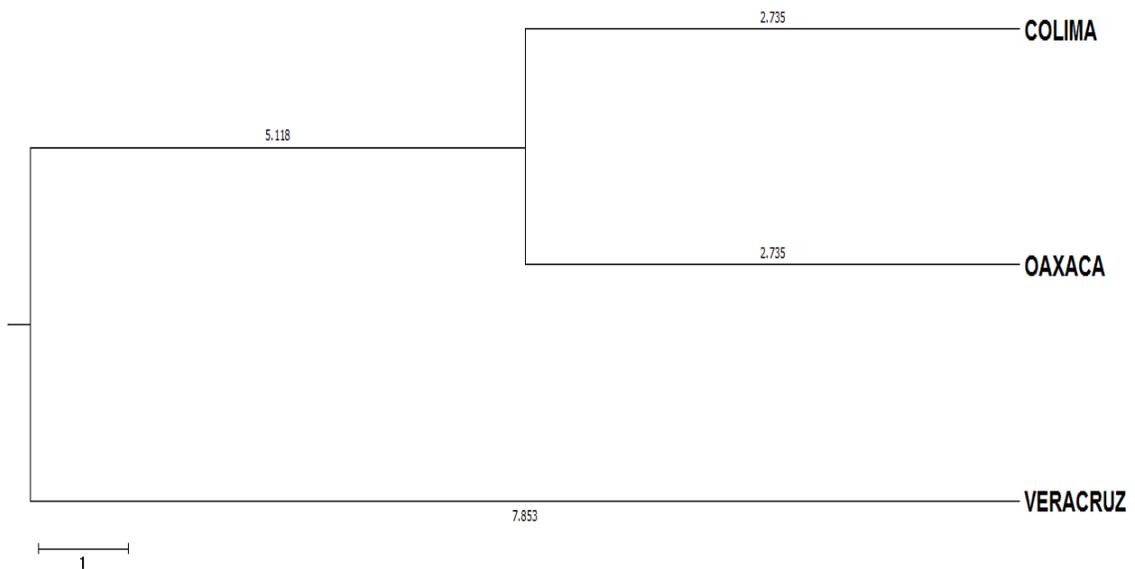


Figura 7. Dendrograma obtenido de los 25 aislados de *L. theobromae* usando marcadores SSR.

CAPÍTULO VI. ARTÍCULO CIENTÍFICO

Secretoma de *Lasiodiplodia theobromae* Agente Causal de la Pudrición de Frutos en Papaya de México

Paola Alejandra Picos-Muñoz, Josefa Adriana Sañudo-Barajas, Josefina León-Félix, Raymundo Saúl García-Estrada, Raúl Allende-Molar *. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Culiacán. Carr a Eldorado Km 5.5 Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, México. CP 80110.

*Autor de correspondencia: ljosefina@ciad.mx; rallende@ciad.mx

Resumen

La identificación de los factores de virulencia en hongos es una herramienta fundamental para el estudio de la patogénesis. En este estudio se realizó una extracción y caracterización de proteínas secretadas por *Lasiodiplodia theobromae* a partir de micelio cultivado *in vitro* en contacto con pared celular inactiva de *Carica papaya*. Las enzimas se recuperaron a partir de medio líquido y precipitación con TCA-Acetona, para la posterior separación de proteínas por electroforesis en 1-D y zimogramas, detectándose actividad extracelular proteolítica y celulolítica. Los datos obtenidos forman una base útil para tratar de comprender el proceso de infección y patogenicidad de *L. theobromae* contribuyendo al desarrollo de estudios proteómicos para la familia *Botryosphaeriaceae*.

Palabras Clave Adicionales

1-D electroforesis, secretoma, *Lasiodiplodia theobromae*, *Carica papaya*.

Abstract

The identification of virulence factors in fungi is a fundamental tool for the study of the pathogenesis. In this study extraction and characterization of secreted proteins by *Lasiodiplodia theobromae* from mycelia grown *in vitro* with inactive cell wall from *Carica papaya* was carried out. Enzymes were recovered from liquid culture and precipitated by TCA-acetone protocol, for posterior protein separation by 1-D gel electrophoresis and zymography, detecting cellulolytic and proteolytic extracellular activity. The data obtained are useful to try to understand the infection process and pathogenicity of *L. theobromae*. It will contribute to the development of proteomic studies of the Botryosphaeriaceae.

Additional Keywords

1D electrophoresis, secretome, *Lasiodiplodia theobromae*, *Carica papaya*.

La papaya es un fruto que se exporta al mercado internacional, principalmente por su consumo en fresco; aunque en años recientes se ha incrementado su uso industrial (Evans y Ballen, 2012). Las especies de *Lasiodiplodia* son importantes patógenos de distintas plantas, especialmente en regiones tropicales y subtropicales en donde ocasionan una gran variedad de enfermedades (Alves *et al.*, 2008). Una de ellas es la pudrición del pedúnculo en frutos de papaya (Perseley y Ploetz, 2003), en la cual se desconoce el mecanismo empleado por el patógeno para infectar al fruto, así

como las interacciones específicas que ocurren durante el proceso de patogénesis (Netto *et al.*, 2014).

El estudio de las interacciones hospedante-patógeno ha estado enfocado hacia el análisis de las proteínas que se expresan en los espacios intercelulares en la planta dado que es uno de los primeros lugares de contacto para la colonización por el patógeno (Girad *et al.*, 2013). En la última década, se ha incrementado el estudio del proteoma de hongos fitopatógenos ampliando el estudio de esta interacción, específicamente en la caracterización de hongos fitopatógenos que pueden contribuir en la elucidación de los mecanismos de infección y en el desarrollo de estrategias de control del mismo (Gonzalez-Fernandez y Jorin-Novo, 2012). En específico existe un aumento en el estudio del secretoma, el cual describe las proteínas que son secretadas por una célula, un tejido o un organismo (Tjalsma *et al.*, 2000). El conocimiento del secretoma es importante pues se sabe que las proteínas secretadas son los principales efectores en las interacciones entre hongos patógenos y sus hospedantes (Rafiqi *et al.*, 2012).

En un estudio con el hongo *Diplodia seriata* al cultivarlo con carboximetilcelulosa como fuente de carbono, se encontraron 75 proteínas reportadas previamente como factores de patogenicidad (Cobos *et al.*, 2010). En otra investigación enfocada en conocer los factores de virulencia que produce el hongo fitopatógeno *Diplodia corticola*, se identificaron 13 proteínas con funciones en virulencia (Fernandes *et al.*, 2014). Otros estudios se enfocan en determinar el grupo al que pertenecen estas proteínas con un perfil potencialmente biotecnológico como es el caso del grupo de celulasas, lacasas, proteasas, lipasas, pectinasas y ureasas principalmente (Esteves *et al.*, 2014)

El objetivo de este estudio fue extraer y caracterizar el secretoma de *Lasiodiplodia theobromae* patogénica en frutos de papaya, mediante la confrontación *in vitro* del hongo con paredes celulares inactivas de papaya.

Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones del cultivo. La cepa de *Lasiodiplodia theobromae* BOM 108 (KT075146 GenBank) se utilizó en este estudio. El hongo se reactivó en medio agar papa dextrosa (PDA) por 5 días; posteriormente discos de 0.5 cm de diámetro con micelio en crecimiento se inocularon en 250 mL de cultivo con sales basales, extractos insolubles en alcohol (pared celular) de papaya Maradol (Báez-Parra 2014), sales basales y como control agua estéril con pared celular sin discos con agar y se colocaron en agitación a 180 rpm por 3 días (Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2010).

Obtención de las proteínas extracelulares. Se tomó una alícuota de 35 mL de cada uno de los medios en las cuales se realizó la extracción de las proteínas extracelulares por el método de Cobos *et al.* (2010). Las alícuotas fueron centrifugadas (48400 xg 1 h a 4°C) para precipitar los polisacáridos. Al sobrenadante se le adicionó un volumen de TCA/acetona (20%/80% p/v) con 14% DTT y se incubó a -20°C por 1 h. Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación (15000 xg, 20 min, 4°C) y el exceso de TCA se removió por precipitación con lavados de 10 mL de acetona fría y 10 mL de 80% acetona fría. Los residuos de acetona fueron secados a temperatura ambiente y el precipitado fue resuspendido en 500 mL de amortiguador de lisis (7M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris) y almacenado a -20°C. Para determinar la concentración se usó el método de Bradford.

Enzimas extracelulares. En cajas Petri con distintos sustratos fueron colocados discos de 5 mm de micelio en crecimiento de *L. theobromae* BOM108; posteriormente, las placas se incubaron a 25° C hasta 48 h dependiendo el medio para la detección de pectinasas, ureasas, lacasas, caseinasas, celulasas y proteinasas (Esteves *et al.*, 2014). La actividad se detectó por la formación de un halo de inhibición alrededor del micelio (caseinasas, ureasas y lacasas) o por la adhesión de colorante al medio observándose el halo de inhibición. (celulasas, pectinasas y proteasas).

Caracterización de enzimas extracelulares por zimografía. Se tomaron alícuotas de la precipitación de proteínas extracelulares y procedió a realizar zimogramas (Esteves *et al.*, 2014). Se diluyeron las alícuotas en buffer de muestra (62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% SDS y 20% glicerol) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida nativos con el sustrato apropiado en una cámara de electroforesis Mini-Protean (Bio-Rad, USA). La electroforesis se efectuó a 120 volt por 120 min a 4° C; posteriormente, el gel fue lavado dos veces con 0.25% Triton X-100 por 60 minutos. Los geles se observaron en el fotodocumentador (Bio-Rad, USA) y se estimó el peso molecular de las proteínas observadas en base al marcador molecular Precision Plus Protein Unstained Standard kDa (Bio-Rad, USA).

Electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE. Donde 30 µg de extracto de proteína se diluyó (1:1) en 8 M urea, 100 mM Tris, 100 mM bicina, 2% SDS, 2% 2-mercaptoetanol, y se calentó por 5 min a 100° C. Las proteínas se separaron en 12.5% SDS-PAGE de acuerdo a Laemmli (1970), por 120 min a 120 V, en una cámara Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, USA). Los geles se observaron en el fotodocumentador (Bio-Rad, USA) y se estimó el peso molecular de las proteínas observadas en base al marcador molecular Precision Plus Protein Unstained Standard kDa (Bio-Rad, USA). Los resultados obtenidos se compararon en las bases de datos MycoCosm (Grigoriev *et al.*, 2014) y JGI Fungal Program MycoCosm (Grigoriev *et al.*, 2011) para la presunta identificación de las proteínas.

Resultados y Discusión

Obtención de proteínas. Se obtuvo una mayor concentración de proteínas en el medio con pared celular de papaya en comparación con el de sales basales (Cuadro 4). Esto podría deberse a que el hongo modificó su maquinaria enzimática al estar en contacto con pared celular de papaya, secretando una mayor cantidad de enzimas que degradan la pared celular del hospedante (Felix *et al.*, 2016).

Actividad enzimática extracelular. Se detectó actividad del grupo de las proteasas, celulasas y pectinasas. De las cuales podemos deducir que el hongo tiene la capacidad de degradar materia orgánica, degradar la defensa de las plantas así como llegar a infectar animales (Gibson *et al.*, 2011).

Identificación de proteínas. El análisis de geles de electroforesis 1 D mostró 14 proteínas (Figura 8), de las cuales se puede identificar presuntivamente a 9 (Cuadro 5) con base en reportes previos en *Macrophomina phaseolina* y *Neofusicoccum parvum*, especies cercanamente relacionadas de la familia Botryosphaeriaceae cuyo genoma ha sido secuenciado (Cobos *et al.*, 2010).

Se encontró una primer enzima (banda 1) presuntivamente una β -Galactosidasa, con un tamaño aproximado de 100 kDa, lo cual era de esperarse debido a que proviene de un aislado patogénico, la función de esta enzima es la degradación de polisacáridos de la pared celular, en específico en la degradación de la celulosa y ha sido reportada como factor de virulencia en otros hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* (Zhang *et al.*, 2014).

Las segundas enzimas encontradas (bandas 2, 3 y 10) con un tamaño de entre 60 y 80 kDa, presuntivamente serían enzimas con actividad Glucano 1,4- α -glucosidasa, en hongos fitopatógenos como *Botrytis cinérea* participan en la degradación de polisacáridos de la pared celular, en la degradación de proteínas y la asimilación de nitrógeno durante la descomposición de materia orgánica y compostas, también en la acidificación del medio facilitando la nutrición y proliferación de la hifa durante el proceso de infección (Gonzalez *et al.*, 2013).

También se encontró enzimas con actividad glico hidrolasas (bandas 4 y 12), de tamaño aproximado a los 45 kDa cuya principal función es degradar polisacáridos en la pared celular, como celulosa y xilanos para poder penetrar el tejido del huésped, estas enzimas de hecho pueden hidrolizar los enlaces peptídicos entre dos o más carbohidratos. Se le ha reportado en organismos patógenos como un factor de virulencia; tal es el caso de *Macrophomina phaseolina* (Schinke *et al.*, 2012). También de las hidrolasas (banda 11) pero con función catalizadora de la ruptura en los enlaces fosfodiéster se determinó presuntivamente la enzima fosfoesterasa (Harren *et al.*, 2013)

Del grupo de las proteasas existe presuntivamente el ácido aspártico (6, 7 y 13), de aproximadamente 25 kDa, el cual participa en la degradación de la matriz extracelular la cual a su vez está compuesta principalmente por

colágenos y otras proteínas, jugando así un papel crucial como factor de virulencia, diseminación y evasión del hospedero. Estas enzimas se han relacionado con patogénesis en humanos, donde participa en la degradación de la matriz extracelular liderando el proceso de infección del patógeno (Duarte *et al.*, 2016).

El grupo restante son del tipo de las Xilanasas (bandas 5, 8, 9 y 14), con tamaños que oscilan entre los 35 y 15 kDa, cuya función principal es la degradación de polisacáridos en la pared celular y pueden en ciertos casos inducir la respuesta de defensa del hospedero (Gibson *et al.*, 2011).

En el Zimograma con gelatina como sustrato (Figura 9) pueden observarse 4 enzimas del tipo de las proteasas, y 3 del tipo celulasas, indicando así la facilidad del patógeno para la penetración de la pared celular del hospedero o bien la habilidad de modificar las señales químicas producidas por el hospedero y así evitar generar respuestas de defensa del huésped (Mastronunzio *et al.*, 2008)

Conclusiones

La actividad enzimática extracelular de *Lasiodiplodia theobromae* fue mayor en presencia de pared celular de papaya, por lo cual podemos asumir que ante la presencia de un hospedero, el hongo *Lasiodiplodia theobromae* puede inducir un arsenal de enzimas capaces de degradar la pared celular e iniciar un proceso infeccioso.

Literatura citada

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

- Báez-Parra K. 2014. Expresión génica y actividad enzimática de glicosilhidrolasas en papaya "Maradol" (*Carica papaya* L.). Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC Unidad Culiacán.
- Cobos R, Barreiro C, Mateos R, Coque J, 2010. Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome Science* 8, 46-62. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-5956-8-46>
- Duarte A, Correia A, Esteves A. 2016. Bacterial collagenases- a review. *Critical Reviews in Microbiology*. 42, 106-126. <http://dx.doi.org/10.31109.1040841X.2014.904270>
- Esteves A, Saraiva M, Correia A, Alves A. 2014. Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Canadian Journal of Microbiology*. 60:332-342. <http://dx.doi.org/10.1139/cjm-2014-1034>
- Evans E, Ballen F. 2012. An overview of global papaya production, trade, and consumption. University of Florida, Tropical Research and Education Center, Homestead, Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>
- Felix C, Duarte A, Vitorino R, Guerreiro A, Domingues P, Correia A, Alves A, Esteves A. 2016. Temperature modulates the secretome of the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. *Frontiers of Plant Science*. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01096>
- Fernandes I, Alves A, Correia a, Devreese B, Esteves AC. 2014. Secretome analysis identifies potential virulence factors of *Diplodia corticola*, a fungal

- pathogen involved in coark oak (*Quercus suber*) decline. *Fungal Biology* 118: 516-523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.04.006>
- Gibson DM, King BC, Hayes ML, Bergstrom GC. 2011. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion in Microbiology* 14, 264-270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mlb.2011.04.002>
- Girard V, Dieryckx C, Job C, Job D. 2013. Secretomes: The fungal strike force. *Proteomics* 13, 597-608.
- González-Fernandez R, Redondo I, Jorrín-Novo JV. 2010. Gel-based proteomic analysis of *Botrytis cinerea*. The simplest 1-DE reveals differences in virulence-related protein abundance among strains. *Proteómica* 5, 128-128.
- González-Fernández R, Aloria K, Valero-Galvan J, Redondo I, Arizmendi JM, Jorrín-Novo JV. 2014. Proteomic analysis of mycelium and secretoma of different *Botrytis cinerea* wild-type strains. *Journal of Proteomics* 97, 195-221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.06.022>
- Gonzalez-Fernandez R, Jorrin-Novo J, 2012. Contribution of proteomics to the study of plant pathogenic fungi. *Journal of Proteome Research* 11, 3-16. <http://dx.doi.org/10.1021/pr200873>
- Gonzalez M, Brito N, Frias M, Gonzalez C. 2013. *Botrytis cinerea* protein O-mannosyltransferases play critical roles in morphogenesis, growth, and virulence. *Plos One* 8:e65924. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078525>

- Grigoriev I, Cullen D, Goodwin S, Hibbett D, Jeffries T, Kubicek C, Kuske C, Magnuson J, Martin F, Spatafora J, Tsang A, Baker S.. 2011. Fueling the future with fungal genomics. *Mycology* 2:192-209.
- Grigoriev I, Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Otilar R, Riley R, Salamov A, Zhao X, Korzeniewski F, Smirnova T, Nordberg H, Dubchak I, Shabalov I. 2014. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research* 41:D699-709.
- Harren K, Brandhoff B, Kno"ndler M, Tudzynski B. 2013. The high-affinity phosphodiesterase BcPde2 has impact on growth, differentiation and virulence of the phytopathogenic Ascomycete *Botrytis cinerea*. *Plos One* 8(11): e78525. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0078525>
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Mastronunzio JE, Tisa LS, Normand P, Benson DR. 2008. Comparative secretoma analysis suggests low plant cell wall degrading capacity in *Frankia* symbionts. *BMC Genomics* 9:47. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-47>
- Netto M, Assuacao I, Lima G, Marques M, Lima W, Monteiro J, Queiroz V, Michereff S, Phillips A, Camara M. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity* 67, 127-141. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4>.
- Perseley D, Ploetz R. 2003. Diseases of papaya. In: Ploetz, R.C. (ed) *Diseases of tropical fruit crops*. CABI, Cambridge, 373-412 pp. <http://dx.doi.org/10.1079/9780851993904.00>

- Rafiqi M, Ellis JG, Ludowici V, Hardham A, Dodds P. 2012. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 477-482.
- Schinke C, Germani J. 2012. Screening Brazilian *Macrophomina phaseolina* isolates for alkaline lipases and other extracellular hydrolases. *International Microbiology* 15:1-7. <http://dx.doi.org/10.2436/20.1501.01.153>
- Tjalsma H, Bolhuis, A, Jongbloed JDH, Bron SI, Van Dijing JM. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*, a genome-based survey of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 515-547.
- Zhang J, Bruton B, Biles, C. 2014. Cell wall-degrading enzymes of *Didymella bryoniae* in relation to fungal growth and virulence in cantaloupe fruit. *European Journal of Plant Pathology* 139, 749-761. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-014-0429-2>

Cuadro 4. Concentración de proteínas de acuerdo al medio en que se cultivó a *L. theobromae*.

<i>Aislado/Medio</i>	<i>Concentración de proteínas ($\mu\text{g ml}^{-1}$)</i>
<i>BOM108/Medio Basal</i>	1600
<i>BOM108/Medio Basal con Pared</i>	3600
<i>Celular Papaya</i>	
<i>Pared Celular Papaya/Agua</i>	0

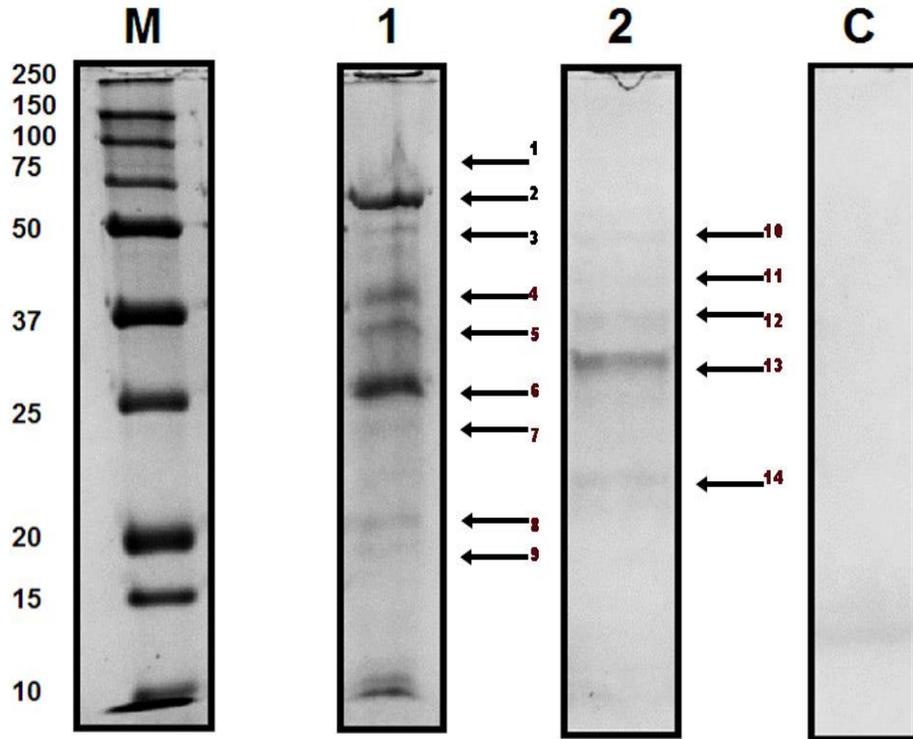


Figura 8. SDS-PAGE del secretoma de *L. theobromae*. M) Marcador Precision Plus Protein Unstained Standard (kDa) 1) Crecimiento de *L. theobromae* en medio mínimo + pared celular de papaya 2) Crecimiento de *L. theobromae* en medio mínimo c) Medio mínimo + pared celular de papaya.

Cuadro 5. Proteínas identificadas en SDS-PAGE

BANDA	PESO MOLECULAR	PROTEÍNA	ORGANISMO	FUNCIÓN
1	100 kDa	β -Galactosidasa	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Actividad β -galactosidasada, metabolismo de carbohidratos
2	80 kDa	Actividad Glucano 1,4- α -glucosidasa	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Procesos catabólicos de los polisacáridos
3, 10	60 kDa	Actividad Glucano 1,4- α -glucosidasa	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Procesos catabólicos de los polisacáridos
11	45 kDa	Fosforesterasa	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Actividad hidrolasa
4, 12	45 kDa	Familia de la glicósido hidrolasas	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Actividad hidrolasa
5	35 kDa	β -Xilansa	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Actividad hidrolasa proceso metabólico de carbohidratos
6, 7 Y 13	25 kDa	Ac. Aspártico tipo endopeptidasa	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Proteólisis
8, 14	20 kDa	β -Xilansa	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Catálisis en la reacción oxido-reducción
9	15 kDa	β -Xilansa	<i>Neofusicoccum parvum</i>	Actividad hidrolasa proceso metabólico de carbohidratos

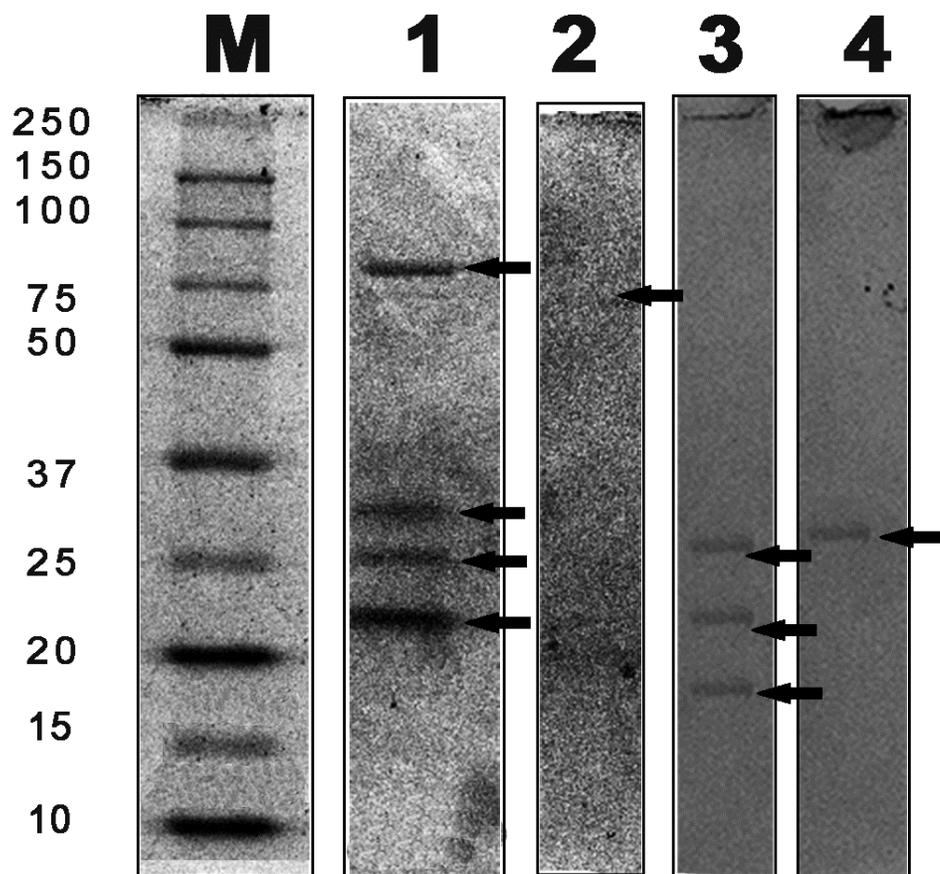


Figura 9. Zimograma de actividad extracelular de *L. theobromae*. M) Marcador molecular 1) Proteasa *L. theobromae* + Pared celular de papaya 2) Proteasa *L. theobromae* 3) Celulasa *L. theobromae* + Pared celular de papaya 4) Celulasa *L. theobromae*

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES GENERALES

En este capítulo se presenta la integración de los resultados y conclusiones reportados en los capítulos IV, V y VI. Así mismo, se sugieren aspectos relacionados con la problemática investigada que pueden ser temas para posteriores investigaciones.

Especies Crípticas

Los resultados mostraron la presencia de dos especies dentro del complejo de especies crípticas de *Lasiodiplodia* afectando el cultivo de papaya en México. En específico, nuestro estudio generó el primer reporte de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, como agente causal de la pudrición en frutos de papaya en México. Este hallazgo muestra que es necesario utilizar herramientas moleculares en los métodos de identificación de hongos fitopatógenos dado que nuestro país es líder en producción y exportación de productos hortofrutícolas y la presencia de microorganismos fitopatógenos continúan siendo una limitante en la producción; por otro lado, es necesario continuar la caracterización permanente de aislados en otras regiones productoras de papaya para determinar si existen especies adicionales a las reportadas en este estudio.

Diversidad Genética

En el estudio de las poblaciones de *Lasiodiplodia theobromae* originarias de distintas regiones productoras de papaya, se confirmó que las barreras geográficas impiden el libre intercambio genético entre las

poblaciones de un microorganismo fitopatógeno. No así el intercambio que podría existir entre las mismas regiones. Esto fue comprobado al encontrar mayor similitud entre poblaciones de *L. theobromae* originarias de regiones localizadas en la vertiente del Océano Pacífico al compararlas con aislados del hongo originarios del Golfo de México. Por lo cual se sugiere una mejora en el manejo cultural del cultivo.

Virulencia

Lasiodiplodia pseudotheobromae es una especie más virulenta que *L. theobromae* en infecciones de frutos de papaya Maradol, sin embargo es necesario realizar estudios adicionales para determinar si esta característica es similar en otros cultivares de papaya y evaluar la resistencia a fungicidas entre las dos especies identificadas.

Secretoma

Se identificaron presuntamente enzimas que actúan como factores de virulencia y la confrontación *in vitro* con el hospedero moduló la expresión de proteínas extracelulares. Sin embargo, es necesario un estudio de expresión génica en condiciones de patogénesis *in vivo* para confirmar la expresión diferencial o constitutiva de estas proteínas.

“La mujer que sigue a la multitud por lo general no llega más allá de la multitud. La mujer que camina por sí sola es probable que se encuentre en lugares en los que nadie ha estado antes”. Albert Einstein