

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

ETIOLOGY AND HISTOPATHOLOGY OF DIEBACK DISEASE ON MAMEY TREES (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) IN GUERRERO, MÉXICO

Alfonso Vázquez-López^{1*}, José A. Mora-Aguilera², Elizabeth Cárdenas-Soriano², Daniel Téliz-Ortiz²

¹Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, Instituto Politécnico Nacional. Calle Hornos 1003, 71230, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. (bremia43@gmail.com). ²Fitosanidad-Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km. 36.5, 56230. Montecillo, Estado de México.

RESUMEN

En Alpayeca, Guerrero, México, la muerte descendente de los árboles de mamey (*Pouteria sapota*) es una enfermedad de etiología desconocida que reduce la productividad y longevidad de los huertos comerciales. En este estudio se determinó la etiología de la enfermedad y los daños anatómicos que causa en ramas. De ramas sintomáticas se aisló consistentemente a *Lasiodiplodia* sp. y su patogenicidad se verificó en ramas de mamey con epidermis y peridermis (con y sin heridas). Después de 30 d el hongo produjo lesiones necróticas en ramas con peridermis inoculadas por heridas y en 24 meses indujo muerte descendente de brotes vegetativos. Las ramas testigo se mantuvieron asintomáticas. Los daños anatómicos en ramas sintomáticas fueron ruptura de peridermis; colapso y necrosis de células corticales, floema, laticíferos, fibras externas del floema y cambium vascular. En floema se formaron cristales y precipitados granulados; los radios y el parénquima axial se lignificaron y se formaron esclereidas. El xilema y la médula no presentaron daños. Con base en sus características morfológicas y moleculares el hongo que indujo muerte descendente de árboles de mamey en Alpayeca, Guerrero fue *Lasiodiplodia theobromae*. La secuencia genética del patógeno se depositó en el banco de genes (NCBI) con número de acceso EU564805.

Palabras clave: *Lasiodiplodia theobromae*, Histopatología, muerte descendente, zapote-mamey.

ABSTRACT

In Alpayeca, Guerrero, México, dieback on mamey trees (*Pouteria sapota*) is a disease of unknown etiology that reduces productivity and longevity of commercial orchards. In this study the etiology of the disease and anatomic damage it causes to branches were determined. From symptomatic branches, *Lasiodiplodia* sp. was consistently isolated, and its pathogenicity was verified on mamey branches with epidermis and peridermis (with and without lesions). After 30 d, the fungus produced necrotic lesions on branches with peridermis inoculated through wounds, and in 24 months it induced dieback of vegetative shoots. The control branches remained asymptomatic. The anatomical damage on symptomatic branches included peridermis rupture, collapse and necrosis of cortical, phloem, and laticiferous cells, and external phloem fibers and vascular cambium. In the phloem, crystals and granular precipitates formed; the radial and the axial parenchyma lignified, and sclereids formed. The xylem and medulla were not damaged. Based on its morphological and molecular characteristics, the fungus that induced dieback on mamey trees in Alpayeca, Guerrero, was *Lasiodiplodia theobromae*. The genetic sequence of the pathogen was deposited in the gene bank (NCBI) with access number EU564805.

Key words: *Lasiodiplodia theobromae*, Histopathology, dieback, mamey sapote.

INTRODUCTION

Mamey sapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore and Stearn) is a primary crop because sustain approximately 95 % of the families of the municipalities of Huamuxtitlán and

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Junio, 2008. Aprobado: Mayo, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 717-728. 2009.

INTRODUCCIÓN

El mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn) es un cultivo primario que soporta aproximadamente 95 % de las familias en los municipios de Huamuxtitlán y Alpoeyca, Guerrero, México generando ingresos importantes de noviembre a marzo de cada año, debido a la precocidad de la producción respecto a otras zonas productoras del país. Sin embargo, los problemas fitosanitarios reducen la productividad y longevidad de los huertos comerciales. Con el fin de diseñar un programa de manejo integrado del cultivo se estudiaron las enfermedades relevantes de este frutal. En Alpoeyca, Guerrero, se encontró una enfermedad de etiología desconocida que induce muerte descendente de ramas estructurales y reproductivas en árboles mayores de 10 años de edad. En el mundo la enfermedad no se había estudiado con precisión. El síndrome de muerte descendente, rajadura de corteza y cáncer de tallo en árboles de zapote (*P. sapota*) en Guatemala se asoció a *Botryosphaeria* sp. e *Hypoxyylon* sp. (Álvarez, 1997) y el tizón y muerte de ramas jóvenes se asoció a *Botryosphaeria theobromae* Pat. y a *Cephaleurus virescens* Kunze (Patel y Chauhan, 1993; Balerdi *et al.*, 1996). En este trabajo se postula que *Lasioidiplodia* sp. induce muerte celular en el tejido infectado y causa síntomas de muerte descendente, por lo que se estudió la etiología y daños anatómicos que induce la muerte descendente en árboles de mamey en Alpoeyca, Guerrero, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Etiología

Sitio de estudio y aislamiento de hongos

En el municipio de Alpoeyca 17° 40' N y 98° 31' O, 960 m de altitud (INEGI, 2006) se recolectaron 25 ramas reproductivas (2 cm diámetro) con síntomas de muerte descendente de árboles de mamey de 14 años de edad, en mayo de 2004. De cada rama se cortaron cinco secciones de tejido interno de 0.5 cm³ que se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 1.0 % por 3 min, se lavaron con agua destilada estéril, se secaron y sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (200 g papa + 12 g dextrosa + 18 g agar L⁻¹ agua destilada). Las cajas se incubaron a 25 °C con luz blanca por 3 d. De los aislamientos obtenidos se realizaron

Alpoeyca, Guerrero, México, generando importantes ingresos from November to March each year, because the production is earlier than in other producer regions of the country. However, phytosanitary problems reduce productivity and longevity of the commercial orchards. Aiming to design a program of integrated management of the crop, the diseases relevant to this fruit tree were studied. In Alpoeyca, Guerrero, a disease of unknown etiology was found to induce dieback on structural and reproductive branches of trees older than 10 years. The disease had not been studied in detail in any part of the world. The dieback syndrome, cracked bark and stem cancer, in sapote trees (*P. sapota*) in Guatemala was associated with *Botryosphaeria* sp. and *Hypoxyylon* sp. (Álvarez, 1997), and blight and death of young branches was associated with *Botryosphaeria theobromae* Pat. and with *Cephaleurus virescens* Kunze (Patel and Chauhan, 1993; Balerdi *et al.*, 1996). In our work, we postulated that *Lasioidiplodia* sp. induces cell death in infected tissue and causes dieback symptoms; for this reason we studied the etiology and anatomical damages that induce dieback in mamey trees in Alpoeyca, Guerrero, México.

MATERIALS AND METHODS

Etiology

Site of the study and isolation of fungi

In the municipality of Alpoeyca 17° 40' N and 98° 31' W, 960 m altitude (INEGI, 2006), 25 reproductive branches (2 cm in diameter) with dieback symptoms were collected from 14-year-old mamey trees in May 2004. From each branch, five 0.5 cm³ sections of internal tissue were cut. These were disinfected with 1.0 % sodium hypochlorite for 3 min, washed with sterile distilled water and dried, then sown in Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) culture medium (200 g potato + 12 g dextrose + 18 g agar L⁻¹ distilled water). The dishes were incubated at 25 °C with white light for 3 d. From the isolations obtained, monospore cultures were done in agar water (18 g agar in 1.0 L⁻¹ distilled water) and increased in PDA.

Pathogenicity tests

Laboratory phase. The purpose of this phase of the experiment was to select an isolate of *Lasioidiplodia* and verify

cultivos monospóricos en agua agar (18 g agar en 1.0 L⁻¹ agua destilada) y aumentaron en PDA.

Pruebas de patogenicidad

Fase de laboratorio. Esta fase experimental fue para seleccionar un aislamiento de *Lasiodiplodia* y verificar su patogenicidad en árboles de mamey. Se evaluó la severidad del daño de 16 aislamientos de *Lasiodiplodia* en frutos de mamey en madurez fisiológica. Estos aislamientos se obtuvieron en 58 % de las 25 ramas muestreadas. Se inoculó un fruto por aislamiento y hubo cuatro testigos. Se desinfectaron 20 frutos con hipoclorito de sodio a 1.5 % por 5 min y se lavaron con agua destilada estéril. En cada fruto se sobrepusieron discos miceliales (0.5 cm diámetro) de 20 d de edad en dos sitios con y sin herida en las secciones apical, central y basal de cada fruto. Las heridas, hechas con un bisturí estéril, fueron cortes (1.0 cm longitud) que atravesaron el epicarpio del fruto. En frutos testigo se colocaron discos de PDA sin inóculo. Los frutos se incubaron en cámara húmeda a 22±2 °C por 12 d. Se evaluó la severidad de daños mediante la dimensión (largo, ancho y profundidad) y volumen del área necrótica de las pudriciones fungosas en la pulpa del fruto y se seleccionó el aislamiento más agresivo de *Lasiodiplodia* sp., para verificar su patogenicidad en ramas anuales.

Patogenicidad en campo. La patogenicidad del aislamiento de *Lasiodiplodia* seleccionado en laboratorio se verificó en árboles de mamey de 14 años de edad en 2005. Se probaron cuatro tratamientos de inoculación: ramas con epidermis con (T1), y sin heridas (T2), y ramas con peridermis con (T3) y sin heridas (T4). Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones. La unidad experimental en T1 y T2 fue una rama (0.5 cm diámetro) menor a un año de edad y en T3 y T4 fue una rama (2.5 cm diámetro) mayor a un año de edad. Las heridas fueron cortes (0.5 cm de longitud) que atravesaron la peridermis y epidermis de las ramas. Previo a la inoculación, las ramas se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 1.0 % por 3 min y se lavaron con agua destilada estéril. En cada unidad experimental se colocó un disco micelial (0.5 cm diámetro) de 20 d de edad. En ramas testigo se colocaron discos de PDA sin inóculo. Las ramas experimentales se cubrieron, en los primeros 20 d, con una bolsa de plástico desinfectada con alcohol al 70 % y un algodón estéril humedecido con agua destilada estéril en su interior. La incidencia de muerte descendente por tratamiento se evaluó 30 d y 24 meses después de la inoculación con la ecuación: $I_i = \sum ni / Ni$, donde: I_i = incidencia de ramas enfermas en el momento i ; ni = número de ramas enfermas en el momento i ; Ni = población total de ramas inoculadas. De tejidos infectados se reaisló al hongo en cultivo puro y se comparó morfológicamente con el hongo inoculado.

its pathogenicity in mamey trees. Severity of the damage caused by 16 *Lasiodiplodia* isolates was assessed in mamey fruits at physiological maturity. These isolates were obtained in 58 % of the 25 sampled branches. One fruit per isolate was inoculated, and there were four control fruits. Twenty fruits were disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for 5 min then washed with sterile distilled water. On each fruit were placed 20-day-old mycelia disks (0.5 cm in diameter) at two sites, one with and one without wounds in the apical, central and basal sections of each fruit. The wounds, inflicted with a sterile scalpel, were cuts (1.0 cm long) that pierced the epicarp of the fruit. The PDA disks placed on the control fruits had no inoculum. The fruits were incubated in a moist chamber at 22±2 °C for 12 d. Severity of the damage was assessed by measuring the dimensions (length, width and depth) and volume of the necrotic area of the fungal rot in the fruit pulp. The most aggressive isolate of *Lasiodiplodia* sp. was selected to verify its pathogenicity in annual branches.

Pathogenicity in the field. In 2005 pathogenicity of the *Lasiodiplodia* isolate selected in the laboratory was verified in 14-year-old mamey trees. Four inoculation treatments were tested: epidermis of branches with (T1) and without (T2) wounds, and peridermis of branches with (T3) and without (T4) wounds. Each treatment was replicated 10 times. The experimental unit for T1 and T2 was one branch (0.5 cm in diameter) older than one year, and for T3 and T4 it was one branch (2.5 cm in diameter) older than one year. The wounds were cuts (0.5 cm long) that pierced the peridermis and epidermis of the branches. Before inoculation, the branches were disinfected with 1.0% sodium hypochlorite for 3 min and washed with sterile distilled water. On each experimental unit was placed a 20-day-old mycelia disk (0.5 cm in diameter). Control branches received disks of PDA without inoculum. During the first 20 d, experimental branches were covered with a plastic bag whose interior was disinfected with 70 % alcohol and a sterile cotton ball moistened with sterile distilled water. The incidence of dieback with each treatment was assessed 30 d and 24 months after inoculation with the equation $I_i = \sum ni / Ni$, where I_i = incidence of diseased branches at moment i , ni = number of diseased branches at moment i , Ni = total number of inoculated branches. The fungus was re-isolated from infected tissues in pure culture and compared morphologically with the fungus inoculum.

Identification of the phytopathogen

Morphological characterization. A monoconidial colony of *Lasiodiplodia* was cultivated in 2 % PDA (BD Bioxon®) at 25 °C and white light for 20 d and identified using the Barnett

Identificación del fitopatógeno

Caracterización morfológica. Una colonia monoconidial de *Lasiodiplodia* se cultivó en PDA al 2 % (BD Bioxon®) a 25 °C y luz blanca por 20 d e identificó siguiendo las claves taxonómicas para género de Barnett y Hunter (2006) y para especie la referencia y claves de Punithalingam (1976) y Burgess *et al.* (2006).

Caracterización molecular. El ADN de *Lasiodiplodia* sp. se extrajo con la técnica de Ahrens y Seemüller (1992). La amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rRNA) se efectuó por PCR usando los iniciadores ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) (Ahrens y Seemüller, 1992), con la siguiente modificación: agua ultrapura estéril (13.22 μ L), solución amortiguadora TBE 1X (2.5 μ L), $MgCl_2$ a 2.5 mM (2.08 μ L), dNTPs a 0.2 mM (2 μ L), iniciadores ITS4 e ITS5 a 20 μ mol (2 μ L de cada uno), DNA polimerasa (Biogenica®) a 1U (0.2 μ L) y muestra problema de ADN a 80 ng (1 mL). El producto amplificado se purificó con el kit Wizard (Promega®) y secuenció con el Genetic Analyzer modelo 3100®, Applied Biosystem. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software Lasergene® 2001, V5 (DNASTAR®, Inc.) y se alinearon con la base de datos del banco de genes del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Las secuencias con el valor más alto de similitud se consideraron para su comparación con las secuencias obtenidas en este estudio.

Histopatología

De 25 ramas con síntomas de muerte descendente se cortaron en secciones de tejido de 1 cm² y se colocaron en solución fijadora FAA [alcohol etílico al 100 % (500 mL), ácido acético glacial (50 mL), formaldehído (100 mL) y agua destilada (350 mL)] por 3 d. El estudio histológico se realizó con las muestras de donde se aisló persistente y exclusivamente a *Lasiodiplodia* sp. El material se retiró de la solución fijadora, se lavó con agua y se deshidrató e infiltró en un procesador automático de tejidos Tissue-Tek® II, modelo 4640-B® (Sakura Finetechnical Co., LTD. Tokio, Japan). La deshidratación fue gradual con una serie ascendente de alcohol etílico (50 %, 70 %, 96 % y 100 %) (4 h/ alcohol) y la infiltración en etanol absoluto+xileno (1:1), tres veces en xileno y dos veces en parafina (Paraplast marca SIGMA) (4 h/inmersión). El tejido infiltrado se incluyó en paraplast fundido y se dejó solidificar por 24 h. El tejido incluido se montó en un microtomo de desplazamiento modelo Spencer 820® (American Optical Company), se obtuvieron cortes de 10 mm de espesor, se colocaron en un baño de flotación con 3.0 g de grenetina disuelta a 68 °C por 30 s y se montaron en portaobjetos. La técnica de

and Hunter (2006) taxonomic keys for the genus and the reference and keys of Punithalingam (1976) and Burgess *et al.* (2006) for the species.

Molecular characterization. DNA was extracted from *Lasiodiplodia* sp with the Ahrens and Seemüller (1992) technique. Amplification of the ITS1 and ITS2 regions of the ribosomal genes (rRNA) was done by PCR using the initiators ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) and ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) (Ahrens and Seemüller, 1992), with the following modification: sterile ultrapure water (13.22 μ L), buffer solution TBE 1X (2.5 μ L), $MgCl_2$ at 2.5 mM (2.08 μ L), dNTPs at 0.2 mM (2 μ L), initiators ITS4 and ITS5 at 20 μ mol (2 μ L each), DNA polymerase (Biogenica®) at 1U (0.2 μ L) and problem sample of DNA at 80 ng (1 μ L). The amplified product was purified with the Wizard kit (Promega®) and sequenced with the Genetic Analyzer® model 3100, Applied Biosystems. The sequences obtained were analyzed with Lasergene® 2001, V5 software (DNASTAR®, Inc.) and aligned with the database of the gene bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/). The sequences with the highest value of similarity were compared with the sequences obtained in this study.

Histopathology

From 25 branches with dieback symptoms, 1 cm² sections of tissue were cut and placed in a FAA fixing solution [100 % ethylic alcohol (500 mL), glacial acetic acid (50 mL), formaldehyde (100 mL) and distilled water (350 mL)] for 3 d. The histological study was performed with the samples from which *Lasiodiplodia* sp. was isolated persistently and exclusively. The material was withdrawn from the fixing solution, washed with water, dehydrated, and later infiltrated in an automatic tissue processor Tissue-Tek® II, model 4640-B (Sakura Finetechnical Co., LTD, Tokyo, Japan). Dehydration was gradual with a series of increasing concentrations of ethylic alcohol (50 %, 70 %, 96 %, and 100 %) (4 h/ concentration) and infiltration in absolute ethanol+xylene (1:1), three times in xylene and twice in paraffin (Paraplast®, SIGMA) 4 h/immersion). The infiltrated tissue was included in melted paraplast and left to solidify for 24 h. The included tissue was mounted in a Spencer® displacement microtome, model 820 (American Optical Company). The 10 mm thick sections obtained were placed in a flotation bath with 3.0 g of grenetina dissolved at 68 °C for 30 s and mounted on a slide. The differential dying technique with rapid safranin green was performed with the methodology of Johansen (1940) and Curtis (1986).

tinción diferencial safranina-verde rápido se realizó con la metodología de Johansen (1940) y Curtis (1986).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de síntomas en campo

La enfermedad se observó en árboles mayores de 10 años de edad. Los síntomas en hojas jóvenes de ramas con epidermis fueron: formación de áreas de color rojo, marchitez, necrosis marginal, enrollamiento hacia el haz, muerte y caída prematura. El ápice de la rama mostró marchitez, necrosis y muerte. La enfermedad descendió a la base de la rama anual e invadió ramas secundarias. Los frutos se momificaron, ennegrecieron y quedaron adheridos a la rama enferma. La enfermedad puede causar la muerte de la mayoría de las ramas o incluso del árbol. El tejido interno de las ramas enfermas fue de consistencia corchosa y con necrosis.

Etiología

Hongos aislados

De 125 trozos de tejido de ramas sintomáticas se aisló a *Lasiodiplodia* sp. (58 %), *Pestalotiopsis* sp. (21.6 %) y *Fusarium* sp. (10.4 %). En 10 % de las secciones no hubo crecimiento micelial.

Pruebas de patogenicidad

Fase de laboratorio. La severidad de daños en la pulpa de los frutos, causados por los cinco aislamientos

RESULTS AND DISCUSSION

Description of symptoms in the field

The disease was observed in trees older than 10 years. The symptoms in young leaves on branches with epidermis were formation of reddish areas, wilting, marginal necrosis, rolling toward the main vein, death and premature abscission. The branch apex exhibited wilting, necrosis and death. The disease descended toward the base of the annual branches and invaded secondary branches. The fruits mummified, blackened and remained attached to the diseased branch. The disease can cause death to most of the branches and even to the tree. The internal tissue of diseased branches was of corky consistence and necrotized.

Etiology

Isolated fungi

Lasiodiplodia sp. (58 %), *Pestalotiopsis* sp. (21.6 %) and *Fusarium* sp. (10.4) were isolated from 125 tissue sections from symptomatic branches. In 10 % of the sections there was no mycelia growth.

Pathogenicity tests

Laboratory phase. Severity of damage to fruit pulp, caused by the five most aggressive *Lasiodiplodia* isolates is shown in Table 1. The isolate *Lasiodiplodia*1 was selected as the most aggressive. *Lasiodiplodia* colonized the fruit pulp only when inoculated in

Cuadro 1. Severidad de daños en la pulpa de frutos de mamey (*Pouteria sapota*) en madurez fisiológica causados por cinco aislamientos de *Lasiodiplodia* a 12 d de inoculados con heridas en laboratorio.

Table 1. Severity of damage in pulp of mamey fruit (*Pouteria sapota*) at physiological maturity caused by five isolates of *Lasiodiplodia* 12 d after inoculation through wounds in laboratory.

Aislamiento fungoso	Área de pudrición	Colonización micelial máxima (cm)			VAN [†] (cm ³)
		Largo	Ancho	Profundidad	
<i>Lasiodiplodia</i> 1	Ápice	3.4	1.5	1.5	2.55
<i>Lasiodiplodia</i> 2	Pedúnculo	3.0	1.0	1.0	0.90
<i>Lasiodiplodia</i> 3	Ápice	2.3	0.7	0.7	0.64
<i>Lasiodiplodia</i> 4	Pedúnculo	1.0	1.0	1.0	0.60
<i>Lasiodiplodia</i> 5	Pedúnculo	0.9	0.8	0.8	0.28
Testigo	Ápice, centro, pedúnculo.	Sin colonización fungosa			

[†] Volumen aproximado (cm³) del área necrótica ❖ Approximate volume (cm³) of the necrotized area.

más agresivos de *Lasiodiplodia*, se indican en el Cuadro 1. Se seleccionó el aislamiento *Lasiodiplodia*1 como el de mayor agresividad. *Lasiodiplodia* colonizó la pulpa del fruto sólo cuando se inoculó en sitios con herida. El hongo produjo micelio algodonoso gris en la pulpa. En los frutos testigo se observó un área necrótica alrededor del sitio con herida pero no hubo crecimiento micelial.

Patogenicidad en campo. *Lasiodiplodia* sp. indujo lesiones necróticas de aproximadamente 10 cm longitud $\times$ 1.0 cm ancho que necrosaron el tejido cortical y profundizaron hacia la médula (Figura 1A) en 20 % de las ramas con peridermis inoculadas por herida a 30 d de la inoculación.

En las ramas testigo se produjo un punto necrótico en el sitio donde se provocó la herida (Figura 1B). A 24 meses de la inoculación, los brotes vegetativos, adyacentes a los sitios inoculados, se marchitaron, necrosaron y murieron en 60 % de las ramas con peridermis inoculadas por herida (Figuras 1C-G). Esta sintomatología fue similar a la que se presentó por infección natural en árboles de mamey en Alpoyeca. Sólo una de las 10 ramas testigo presentaron

sites with wounds. The fungus produced cottony gray mycelia in the pulp. In control fruits a necrotic area around the wound site was observed, but there was no mycelial growth.

Pathogenicity in the field. *Lasiodiplodia* sp., 30 d after inoculation, had induced necrotic lesions of approximately 10 cm long $\times$ 1.0 cm wide, which necrotized cortical tissue and penetrated to the medulla (Figure 1A) in 20 % of the branches whose peridermis was inoculated through a wound.

In control branches, a necrotic spot appeared in the wound site (Figure 1B). Twenty-four months after inoculation, the vegetative shoots adjacent to the inoculation sites wilted, necrotized and died on 60 % of the branches with peridermis inoculated through wounds (Figures 1C-G). This symptomatology was similar to that found on naturally infected mamey trees in Alpoyeca. Only one of the 10 control branches showed symptoms, evidencing latent pre-existing infection. Because of the absence of external symptoms between month 2 and 23 after inoculation, internal dieback symptomatology was not assessed. The studies on



Figura 1. Ramas de mamey con síntomas de muerte descendente. A) Lesión necrótica (Ln) inducida por *Lasiodiplodia* sp. en una rama con peridermis a los 30 d de la inoculación por herida. B) Testigo: Rama con peridermis con un punto necrótico en el sitio con herida. C y D) Muerte de brotes vegetativos. E-G) Ramas con peridermis adyacentes a los sitios inoculados por herida 24 meses después de la inoculación (triángulos). Las heridas en las ramas están señaladas con flechas.

Figure 1. Mamey branches with dieback symptoms. A) necrotic lesion (Ln) 30 d after inoculation of *Lasiodiplodia* sp. through wound in branch with peridermis. B) Control: branch peridermis showing a necrotic spot in the wound site. C and D) dead vegetative shoots. E-G) branches with peridermis adjacent to the sites 24 months after inoculation through a wound (triangles). The lesions on branches are marked with arrows.

síntomas, lo cual evidenció una infección latente ya preexistente. Por ausencia de síntomas externos entre el mes 2 y 23 después de la inoculación, no se evaluó la sintomatología interna de muerte descendente. Los estudios sobre enfermedades de ramas de *P. sapota* son limitados, Álvarez (1997) describió síntomas de muerte descendente, rajadura de corteza y cáncer de tallo en árboles de zapote (*P. sapota*) en Guatemala y los relacionó a *Botryosphaeria* sp. e *Hypoxylon* sp., mientras que Patel y Chauhan (1993) y Balerdi *et al.* (1996) indicaron que *Botryodiplodia theobromae* Pat. y *Cephaleurus virescens* Kunze (alga roja) causan tizón y muerte de brotes jóvenes (retoños) de *P. sapota* en la India y en los EE.UU.

En el presente estudio, *Lasiodiplodia* sp. sólo causó infección cuando se inoculó directamente sobre el tejido cortical; su hábito de penetración micelial por heridas fue mencionado por Ploetz *et al.* (1996) y Pavlic *et al.* (2004). Sin embargo, cuando el hongo colonizó el tejido cortical de las ramas experimentales actuó como un patógeno primario al expresar su potencial de causar enfermedad. La tasa de incidencia en campo posiblemente se limite debido al lento crecimiento e invasión del hongo en el tejido vivo ya que primero debe inducir muerte celular, como lo hace *Botryodiplodia theobromae* en tejidos leñosos de cítricos (Davis *et al.*, 1987). La muerte descendente de árboles frutales puede resultar de la interacción de *L. theobromae* con estrés hídrico, suelos arcillosos, escasa materia orgánica, elevada cantidad de caliza activa, fertilización inadecuada, exceso de riego, alta humedad por sombra intensiva, quemadura de sol, presencia de heridas y suelos compactados que complican el desarrollo radicular, nutrición y aireación (Reckhaus y Adamou, 1987; Agustí, 2003).

Los árboles de mamey en Alpayeca pueden ser susceptibles a la enfermedad por factores como presencia de heridas en ramas por causas naturales o por el uso de herramientas de corte en la cosecha; alcalinidad del suelo (pH 7.6-8.0) y desbalance hídrico y nutricional. En la zona de estudio, *L. theobromae* libera la mayor cantidad de esporas asexuales de junio a noviembre y es posible que se dispersen por las gotas de lluvias a distancias cortas y por el aire a mayores distancias, como sucede en cítricos (Ko *et al.*, 2004). La secadera de ramas sobre la producción de mamey es significativa porque disminuye la cantidad de frutos y se reduce la longevidad de los huertos comerciales, como sucede en cítricos (Agustí, 2003).

branch diseases of *P. sapota* are limited; Álvarez (1997) described dieback symptoms, cracked bark and stem cancer, in sapote (*P. sapota*) in Guatemala and related them to *Botryosphaeria* sp. and *Hypoxylon* sp., while Patel and Chauhan (1993) and Balerdi *et al.* (1996) attributed blight and death of young *P. sapota* shoots to *Botryodiplodia theobromae* Pat. and *Cephaleurus virescens* Kunze (red algae) in India and the USA.

In our study, *Lasiodiplodia* sp. caused infection only when it was inoculated directly over cortical tissue; its habit of mycelia penetration through lesions was mentioned by Ploetz *et al.* (1996) and Pavlic *et al.* (2004). However, when the fungus colonized the cortical tissue of the experimental branches, it acted as a primary pathogen expressing its potential for causing disease. The rate of incidence in the field is limited, possibly due to the fungus' slow growth and invasion of live tissue since it must first induce cell death, as does *Botryodiplodia theobromae* in the woody tissue of citrus trees (Davis *et al.*, 1987). Dieback in fruit trees may be a result of the interaction between *L. theobromae* and the effects of water stress, clay soils, scarce organic matter, high amounts of active lime, inadequate fertilization, excess irrigation, high humidity in intensive shade, sunburn, lesions or compacted soils that complicate root development nutrition and aeration (Reckhaus and Adamou, 1987; Agustí, 2003).

Mamey trees in Alpayeca can become susceptible to disease due to factors such as lesions on branches from natural causes or from use of cutting tools for harvesting, soil alkalinity (pH 7.6-8.0) and water and nutritional imbalances. In the study zone, *L. theobromae* releases the greatest quantity of asexual spores from June to November, and it is possible that they are dispersed short distances by raindrops or long distances by air, as occurs in citrus producing areas (Ko *et al.*, 2004). The drying up of branches has a significant effect on mamey production because it decreases the number of fruits and reduces longevity of commercial orchards, as occurs with citrus trees (Agustí, 2003). In our study, the pathogenicity of *Pestalotiopsis* sp. was not verified because of its endophytic habit in mamey trees in Alpayeca. *Fusarium* sp. did not exhibit pathogenic capacity when it was inoculated in wounds on stems of mamey saplings.

En el presente estudio no se verificó la patogenicidad de *Pestalotiopsis* sp. debido a su hábito endófito en los árboles de mamey en Alpoyecá. *Fusarium* sp. no mostró capacidad patogénica cuando se inoculó en tallos con heridas de plántulas de mamey.

Identificación morfológica y molecular del hongo fitopatógeno

La colonia en PDA a 30 d de incubación fue café oscuro con micelio aéreo. Picnidios ostiolados solos o agregados en tejido estromático. Conidios inmaduros amerosporas, hialinos, elipsoides, granulados, grosor de pared $<2\ \mu\text{m}$ y base truncada. Conidios maduros didimosporas de color café oscuro, elipsoides de $19.44\text{--}26.73 \times 10.21\text{--}13.37\ \mu\text{m}$ (promedio $23.07 \times 11.84\ \mu\text{m}$), estrías longitudinales y base truncada. Relación largo/ancho de los conidios 1.95:1. Las características de este aislamiento coincidieron con las de *L. theobromae* reportadas por Punithalingam (1976) y Burgess *et al.* (2006). El análisis molecular confirmó a *L. theobromae* como agente causal de muerte descendente. La secuencia genética de este hongo se homologó en 98 % con *L. theobromae* depositado en el banco de genes (NCBI) con número de acceso EF622073 (542 pb). La secuencia genética de *L. theobromae* patogénico en esta investigación se depositó en el NCBI con número de acceso EU564805 (540 pb).

Histopatología

Descripción anatómica de ramas asintomáticas

Peridermis con células ovales, parenquimatosas, paredes anticlinales y periclinales engrosadas, lignificadas, con puntuaciones y polifenoles (Figuras 2A-B). Peridermis con lenticelas (Figura 2A). Corteza con células rectangulares y parenquimatosas y células isodiamétricas con polifenoles. Estrato externo de la corteza con abundantes esclereidas y estrato interno con abundantes laticíferos (Figura 2A). Entre la corteza y floema se observó un estrato discontinuo de fibras externas del floema (Figuras 2A y C). Floema con células dispuestas en planos axial y radial. Plano axial con tubos cribosos con células acompañantes; grupos de fibras con células poligonales y esclerenquimatosas con paredes gruesas, lignificadas y células parenquimatosas con polifenoles (Figuras 2A, D y

Morphological and molecular identification of the fungal phytopathogen

The colony growing in PDA, after 30 d of incubation, was dark brown with aerial mycelia, ostiolate picnidia alone or aggregate in stromatic tissue. Immature conidia had hyaline, ellipsoid, granular amerospores with $<2\ \mu\text{m}$ thick wall, and truncate base. Mature conidia had dark brown ellipsoid didymospores $19.44\text{--}26.73 \times 10.21\text{--}13.37\ \mu\text{m}$ (average $23.07 \times 11.84\ \mu\text{m}$) with lengthwise striae and truncate base. The length/width ratio of the conidia is 1.95:1. The characteristics of this isolate coincide with those of *L. theobromae* reported by Punithalingam (1976) and Burgess *et al.* (2006). Molecular analysis confirmed *L. theobromae* as the causal agent of dieback. The genetic sequence of this fungus was 98 % homologous to *L. theobromae* deposited in the gene bank (NCBI) with access number EF622073 (542 pb). The genetic sequence of pathogenic *L. theobromae* isolated in this study was deposited in the NCBI with access number EU56408 (540 pb).

Histopathology

Anatomic description of asymptomatic branches

Peridermis cells are oval, parenchymatous, and contain polyphenols; its walls are thickened lignified anticlinal and periclinal with punctation (Figures 2A-B). Peridermis has lenticels (Figure 2A). The cortex has rectangular parenchymatous cells and isodiametric cells with polyphenols. External layer of the cortex has abundant sclereids and the internal layer abundant laticifers (Figure 2A). Between the cortex and phloem, a discontinuous layer of external phloem fibers was observed (Figures 2A and 2C). Phloem cells are disposed in axial and radial planes. The axial plane has cribose tubes and companion cells, groups of fibers with lignified thick-walled polygonal sclerenchymatous cells and parenchymatous cells with polyphenols (Figures 2A, D and E). The radial plane has meristematic cells with polyphenols. Vascular cambium shows parenchymatous cells giving origin to secondary phloem and xylem (Figure 2A). Xylem has axial and radial systems. In the axial system, there were tracheids, veins, fibers and parenchymatous

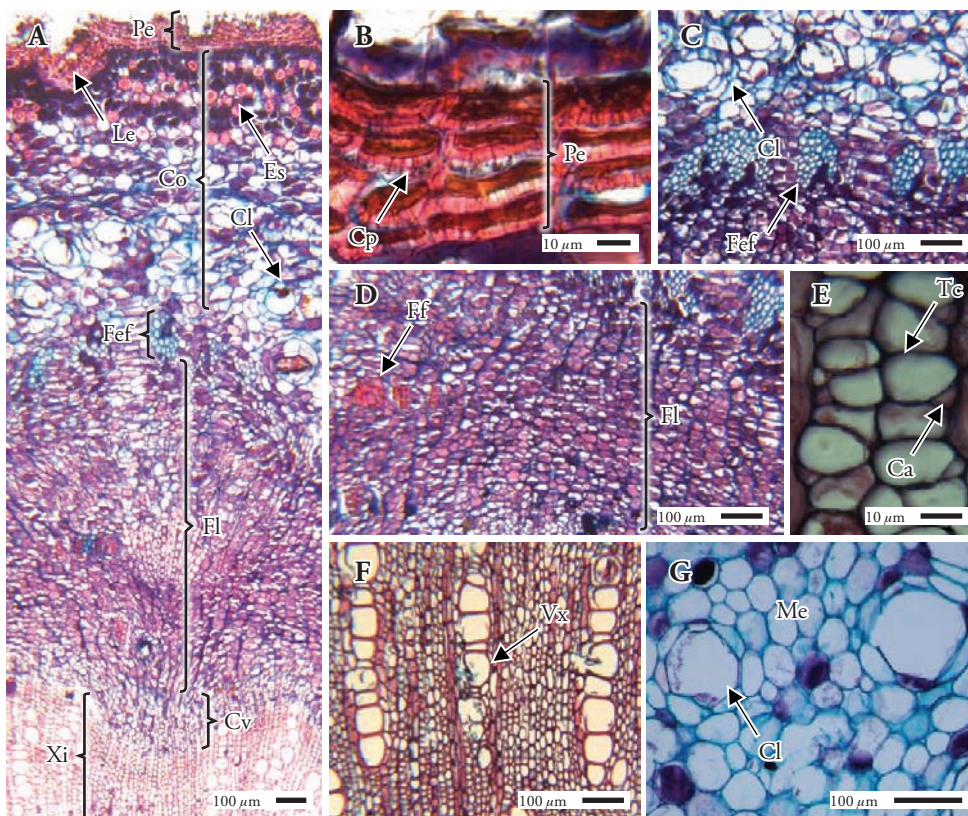


Figura 2. Corte histológico transversal de una rama sana de mamey. A) Peridérmis (Pe) con lenticelas (Le); corteza (Co) con esclereidas (Es) y laticíferos (Cl); fibras externas del floema (Fef); floema (Fl); cambium vascular (Cv) y xilema (Xi). B) Células peridérmicas engrosadas periclinal y anticlinalmente. C) Capa de Fef. D) Fibras del floema (Ff). E) Tubos cribosos (Tc) con células acompañantes (Ca). F) Vasos del xilema (Vx). G) Médula (Me) con laticíferos (Cl).

Figure 2. Histological cross section of a healthy mamey branch. A) Peridermis (Pe) with lenticels (Le); bark (Co) with sclereids (Es) and laticifers (Cl); external phloem fibers (Fef); phloem (Fl); vascular cambium (Cv) and xylem (Xi). B) Peridermal cells thickened periclinal and anticlinally. C) Layer of Fef. D) phloem fibers (Ff). E) Cribrose tubes (Tc) with companion cells (Ca). F) Veins of the xylem (Vx). G) Medulla (Me) with laticifers (Cl).

E). Plano radial con células meristemáticas con polifenoles. Cambium vascular con células parenquimatosas dando origen al floema y xilema secundario (Figura 2A). Xilema con un sistema axial y radial. En el primero hubo traqueidas, vasos, fibras y células parenquimatosas (Figura 2F). El sistema radial se conformó de células parenquimatosas con polifenoles. Médula con células parenquimatosas isodiamétricas, algunas con polifenoles, y abundantes laticíferos (Figura 2G).

Descripción anatómica de ramas sintomáticas

El tejido peridérmico se fracturó, sin embargo, las células conservaron su morfología (Figuras 3A y

cells (Figure 2F). The radial system comprised parenchymatous cells with polyphenols. Medulla has isodiametric parenchymatous cells, some with polyphenols, and abundant laticifers (Figure 2G).

Anatomic description of symptomatic branches

Although the peridermic tissue fractured, cell morphology was preserved (Figures 3A and B). The bark cells initially collapsed and necrotized; as the diseased advanced, laticifers collapsed and necrotized, while sclereids conserved their shape (Figures 3B and C). The external fibers of the phloem also collapsed (Figures 3D). Cells of the secondary phloem collapsed and necrotized (Figure 3A) and, as necrosis advanced,

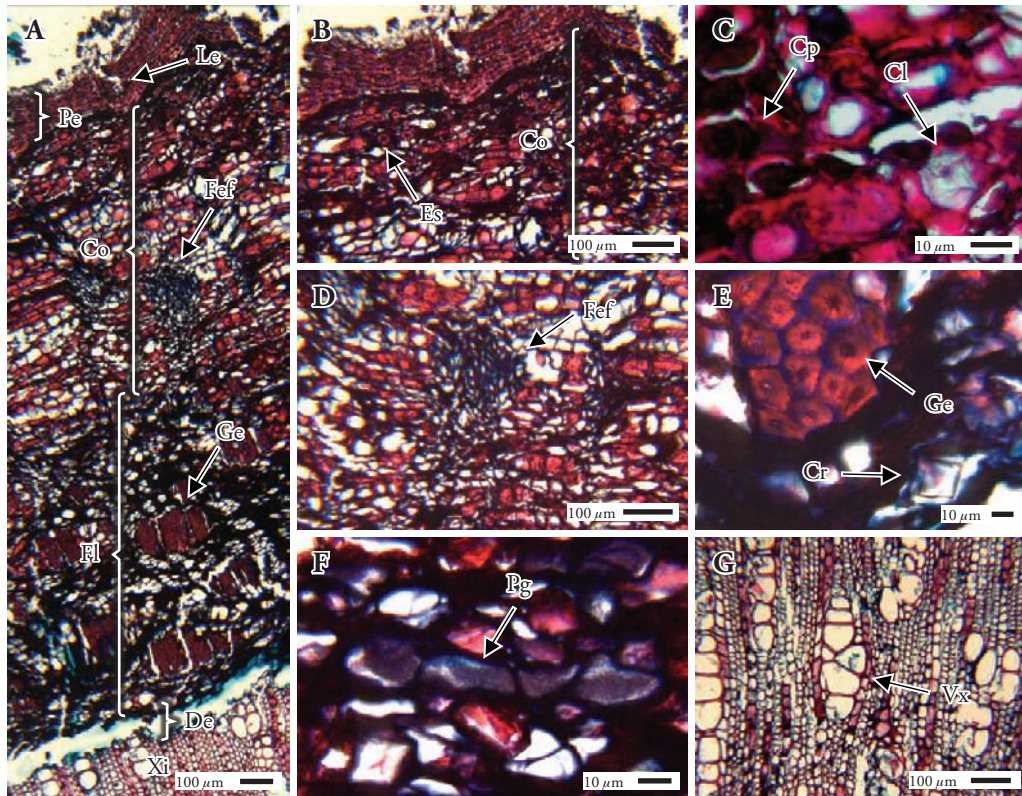


Figura 3. Corte histológico transversal de una rama de mamey con síntomas de muerte descendente. A) fractura de peridermis (Pe) y lenticelas (Le); colapso y necrosis cortical (Co), fibras externas del floema (Fef) y floema (Fl) con grupos de esclereidas (Ge); desprendimiento del floema-xilema (De) y xilema (Xi). B) Colapso y necrosis de células corticales (Co). C) Colapso y necrosis de laticíferos (Cl). D) Colapso de Fef. E) Grupos de esclereidas (Ge) y cristales rectangulares (Cr) en floema. F) Precipitados granulosos (Pg) en la células de Co y Fl. G) Vasos del xilema (Vx).

Figure 3. Histological cross section of a mamey branch with dieback symptoms. A) Rupture of peridermis (Pe) and lenticels (Le); cortical (Co) collapse and necrosis, external phloem fibers (Fef) and phloem (Fl) with groups of sclereids (Ge); detachment of phloem-xylem (De) and xylem (Xi). B) Collapse and necrosis of cortical cells (Co). C) Collapse and necrosis of laticifers (Cl). D) Collapse of Fef. E) Groups of sclereids (Ge) and rectangular crystals (Cr) in phloem. F) granular precipitates Pg) in Co and Fl cells. G) Xylem veins.

B). Las células de la corteza inicialmente se colapsaron y necrosaron; el avance de la enfermedad ocasionó colapso y necrosis de laticíferos; las esclereidas conservaron su forma (Figuras 3B y C). Las fibras externas del floema se colapsaron (Figura 3D). Las células del floema secundario se colapsaron y necrosaron (Figura 3A) y conforme la necrosis avanzó, se formaron cristales rectangulares y precipitados granulosos (Figuras 3E y F). En etapas finales de la enfermedad el floema secundario aumentó y la corteza sufrió necrosis por lo que la mayor parte del floema lo ocuparon los radios dilatados cuyas células parenquimatosas sufrieron esclerenquimatización. Lo mismo ocurrió en el parénquima axil por lo que se formaron grupos de esclereidas (Figuras 3A y E)

rectangular crystals and granular precipitates formed (Figures 3E and F). In the final stages of the disease, the secondary phloem increased and the bark suffered necrosis, and thus most of the phloem was occupied by the dilated radii whose parenchymatous cells underwent sclerenchymatization. The same occurred in the axil parenchyma, and thus groups of sclereids formed (Figures 3A and E) in the internal part of the functional phloem. The vascular cambium collapsed and exhibited necrosis (Figure 3A). The xylem tissue preserved its form and structure. No obstruction of the veins by occlusions or ergastic substances was observed. The medulla maintained the characteristics described in asymptomatic tissue. No previous histological studies of mamey were found.

en la parte interna del floema funcional. El cambium vascular colapso y exhibió necrosis (Figura 3A). El tejido xilemático conservó su forma y estructura, no se observó obstrucción por oclusiones o sustancias ergásticas en el interior de los vasos. La médula mantuvo las características descritas para el tejido asintomático. No se encontraron antecedentes de estudios histológicos en mamey.

Atia *et al.* (2003) observaron algunos síntomas microscópicos similares a los presentados en ramas de mamey en ramas de uva (*Vitis vinifera* L.) infectadas con *L. theobromae*. Milholland (1970) mencionó que este tipo de hongos crecen y avanzan lentamente en el tejido vivo del hospedante debido a su carácter saprofítico porque primero debe inducir muerte celular. En cítricos la enfermedad conocida como muerte súbita causa síntomas similares a los descritos en el presente estudio: colapso y necrosis de los tubos cribosos y las células acompañantes del floema funcional, presencia de cristales romboédricos y lignificación en células parenquimatosas del floema. Estos antecedentes sugieren que el colapso y necrosis de los elementos cribosos del floema pueden impedir el flujo de fotoasimilados, y subsecuentemente, provocar la muerte de ramas por inanición como sucede en árboles de cítricos con daños en el floema debido al ataque del virus tristeza de los cítricos (Román *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

En México, este estudio es el primero que determina a *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal de la muerte descendente del mamey (*P. sapota*).

Lasiodiplodia theobromae produjo lesiones necróticas internas y externas en ramas de mamey con crecimiento secundario (peridermis) inoculadas por heridas. El hongo indujo muerte descendente en brotes vegetativos; otros daños anatómicos internos fueron rompimiento de peridermis, colapso y necrosis de la corteza, fibras externas, floema funcional y laticíferos; formación de cristales y precipitados granulosos en corteza y floema. El hongo no mostró capacidad de penetración directa, lo cual confirma su parasitismo débil.

LITERATURA CITADA

Agustí, M. 2003. Citricultura. Mundi-Prensa. Madrid, España. 422 p.

Atia *et al.* (2003) observed microscopic symptoms in grape vines (*Vitis vinifera* L.) infected with *L. theobromae* similar to those occurring in mamey. Milholland (1979) mentioned that fungi of this type grow and advance slowly in the living tissue of the host because of its saprophytic traits since it must first induce cell death. In citrus trees, the disease known as “sudden death” causes symptoms similar to those described in our study: collapse and necrosis of the cribrose tubes and companion cells of the functional phloem, presence of rhombohedral crystals, and lignification in parenchymatous cells of the phloem. These antecedents suggest that the collapse and necrosis of the cribrose elements of the phloem can impede the flow of photoassimilates and, subsequently, provoke death of the branches from starvation, like that which occurs in citrus trees with damage to the phloem due to attack by the citrus tristeza virus (Román *et al.*, 2004).

CONCLUSIONS

This is the first study in México to determine that *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of dieback in mamey (*P. sapota*).

Lasiodiplodia theobromae produced internal and external lesions in mamey branches with secondary growth (peridermis) inoculated through wounds. The fungus produced dieback in vegetative shoots; other internal anatomic damages were rupture of the peridermis, collapse and necrosis of the bark, external fibers, functional phloem and laticifers, and formation of crystals and granular precipitates in bark and phloem. The fungus did not exhibit ability for direct penetration, which confirms its weak parasitism.

—End of the English version—



Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.

Álvarez V., G. 1997. La muerte descendente y el cáncer del tallo en el zapote. *Tikalía* 15: 37-46.

Atia, M. M. M., A. Z. Aly, M. R. A. Tohamy, H. El-Shimy, and M. A. Kamhawy. 2003. Histopathological studies on

- grapevine die-back. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 110: 131-142.
- Balerdi, C. F., J. H. Crane, and I. Maguire. 1996. Mamey sapote growing in the Florida home landscape. Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/MG/MG33100.pdf> (Consultado: abril de 2008).
- Barnett, L. H., and B. B. Hunter. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Burgess, T. I., P. A. Barber, S. Mohali, G. Pegg, W. de Beer, and M. J. Wingfield. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. Mycologia 98: 423-435.
- Curtis P., J. 1986. Microtécnica Vegetal. Trillas, México. 106 p.
- Davis, R. M., C. J. Farrald, and D. Davila. 1987. Botryodiplodia trunk lesions in Texas citrus. Plant Dis. 71: 848-849.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2006. Anuario Estadístico de Guerrero. México. 383 p.
- Johansen, D. A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw Hill, New York, USA. 503 p.
- Ko, W. H., I. T. Wang, and P. J. Ann. 2004. Lasiodiplodia theobromae as a causal agent of Kumquat dieback in Taiwan. Plant Dis. 88: 1383.
- Milholland, R. D. 1970. Histology of Botryosphaeria canker of susceptible and resistant highbush blueberries. Phytopathology 60: 70-74.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Consultado: abril de 2008).
- Patel, P. B., and H. L. Chauhan. 1993. Twig blight of sapota caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat.: a new record. Indian J. Mycol. and Plant Pathol. 23: 219.
- Pavlic, D., B. Slippers, T. A. Coutinho, M. Gryenhout, and M. J. Wingfield. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. Studies in Mycol. 50: 313-322.
- Ploetz, R. C., D. Benscher, A. Vazquez, A. Colls, J. Nagel, and B. Schaffer. 1996. A reexamination of mango decline in Florida. Plant Dis. 80: 664-668.
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI description of pathogenic fungi and bacteria. No. 519. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Reckhaus, P., and I. Adamou. 1987. Hendersonula dieback of mango in Niger. Plant Dis. 71: 1045.
- Román M., P., M. Cambra, J. Juárez, P. Moreno, N. Durán-Vila, F. A. O. Tanaka, E. Alves, E. W. Kitajina, P. T. Yamamoto, R. B. Bassanezi, D. C. Teixeira, W. C. Jesus Junior, A. J. Ayres, N. Gimenes-Fernandes, F. Rabenstein, L. F. Girotto, and J. M. Bové. 2004. Sudden death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease. Plant Dis. 88: 453-467.
- SIAP (Servicio de Información y estadística Agroalimentaria y Pesquera). 2006. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.siap.gob.mx/> (Consultado: abril de 2008).
- Zamora M., T., E. Cárdenas S., J. F. Cajuste B., y M. T. Colinas L. 2001. Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en frutos de aguacate 'Hass'. Agrociencia 35: 237-244.