

**Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte
Doctorado en Ciencias Agropecuarias**



TESIS:

“Identificación y patogenicidad de hongos de la madera asociados a la muerte descendente del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) y su incidencia por una mala técnica de poda en el norte de Sinaloa.”

**Que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

MC. Iris Alejandrina González Molotla

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Fernando Alberto Valenzuela Escoboza

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Blanca Elvira López Valenzuela

Asesores:

Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez

Dr. Hugo Beltrán Peña

Dr. Quintín Armando Ayala Armenta

Juan José Ríos, Sinaloa, México; a diciembre de 2024.



UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.



ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **IRIS ALEJANDRINA GONZÁLEZ MOLOTLA**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR

Dr. Fernando Alberto Valenzuela Escoboza

CO-DIRECTORA

Dra. Blanca Elvira López Valenzuela

ASESORA

Dra. Glenda Judith Lizárraga Sánchez

ASESOR

Dr. Hugo Beltrán Peña

ASESOR

Dr. Quintín Armando Ayala Armenta

Juan José Ríos, Sinaloa, México, diciembre de 2024

DEDICATORIA

A mis hijas:

Madeleine, Karla y Lisbeth

Por ser mi motor y mi mundo, porque siempre me han inspirado para ser mejor y regalarme la mejor aventura... Son y serán mi mejor proyecto, mi inspiración y mi refugio... Son lo mejor que la vida me ha dado...

A José Juan

Por haberme dedicado parte de su vida...

A mis padres:

Blanquita y Manuel (†)

Por los principios y valores que me inculcaron, por su cuidado, amor y compañía

A Nancy (†)

Por que te extraño todos los días...

A mi linda familia, porque siempre están a mi lado...

La vida me ha permitido transitar este camino, en el que todos aquellos que han formado parte de mi vida, han puesto su granito de arena para contribuir en mi constitución como persona, sin ustedes no estaría aquí...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y al Universo por la oportunidad de llegar a este momento, por darme valor y la entereza para alcanzar este grado, pero, sobre todo, por permitirme disfrutar de la experiencia, el aprendizaje, los tropiezos y todo lo nuevo que se me presento a cada paso.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa por darme las facilidades y herramientas para mi formación y con esto obtener este grado académico.

Al Doctor Fernando Alberto Valenzuela Escoboza, por su gran apoyo, compromiso, confianza y disponibilidad para guiarme durante el desarrollo de esta investigación, por creer en mí...

A la Doctora Glenda Judith Lizárraga Sánchez, por impulsarme a cada momento, por su enorme colaboración durante el desarrollo del presente trabajo, por confiar en mí, por su respaldo, su guía y su convicción, por ser una excelente profesional, comprometida con todo, por ser una hermosa persona.

Dra. Blanca Elvira López Valenzuela, por su compromiso y el tiempo dedicado, sus aportaciones, observaciones y sugerencias de gran valor durante el desarrollo del presente trabajo y las contribuciones para mi formación.

Dr. Hugo Beltrán Peña, por su gran colaboración y las aportaciones para mejorar el presente trabajo, por el tiempo dedicado, por el amor y respeto a su profesión.

Dr. Quintín Armando Ayala Armenta, por el apoyo y el tiempo dedicado y por sus valiosas aportaciones y gran colaboración.

Al Doctor Miguel Apodaca Sánchez, por su compromiso y amistad a lo largo del tiempo, por su gran apoyo, sus consejos, sugerencias y por las grandes contribuciones para la realización del presente trabajo... por su admirable labor como docente.

A la M.C. América Jazmín Cota Alvares por su gran colaboración y apoyo para el desarrollo de este trabajo, por sus sugerencias y sobre todo por su gran amistad.

Al M.C. Edgar Valenzuela Cuadras, por su amistad y disponibilidad para trabajar en los momentos difíciles.

A los M.C. Karen Rábago y Juan Luis Pérez, por amistad y disponibilidad para aportar cosas nuevas. A todas las personas que de manera directa o indirecta me han apoyado. A todos ustedes gracias...

Contenido

Índice de figuras.....	iii
Índice de cuadros.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1 INTRODUCCIÓN.....	4
1.2 REVISION LITERARIA.....	6
1.2.1 Origen del arándano.....	6
1.2.2 Distribución.....	9
1.2.3 Clasificación taxonómica del arándano.....	10
1.2.4 Descripción y ecología de las ericáceas.....	10
1.2.5 Generalidades del cultivo.....	15
1.2.6 Requerimientos del cultivo:.....	16
1.2.7 Establecimiento del arándano como cultivo.....	17
1.2.8 Poda del arándano.....	19
1.2.9 Problemas fitosanitarios del arándano en México.....	23
1.2.10 Genómica.....	30
1.3 Planteamiento del problema.....	33
1.4 Justificación.....	33
1.5 HIPÓTESIS.....	34
1.6 OBJETIVOS.....	34
1.6.1 Objetivo general.....	34
CAPÍTULO 2: Hongos fitopatógenos asociados a la muerte descendente del arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.), su manejo con poda y sellado en el norte de Sinaloa, México.....	35
2.1 INTRODUCCIÓN.....	37
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.2.1 Área de estudio y recolecta de material.....	37
2.2.3 Obtención de aislados y purificación.....	39
2.2.4 Preservación de aislados.....	39
2.2.5 Descripción fenotípica de las colonias.....	40

2.2.6 Análisis estadístico	41
2.2.7. Patología general.....	41
2.3 Resultados	43
2.3.1. Crecimiento micelial de especies de <i>Lasiodiplodia</i> obtenidas de arándano variedad Biloxi en medio MEA OMA V8A Y PDA.	48
2.3.2. Discusión	52
2.4. Conclusiones.....	53
CAPÍTULO 3. Etiología de la muerte descendente del arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) en el norte de Sinaloa, México.....	54
3.1 Introducción.....	56
3.2 Materiales y métodos	57
3.2.1 Selección de aislados	57
3.2.2 Extracción de ADN con CETAB.....	57
3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
3.2.4 Electroforesis	58
3.2.5 Purificación de productos de PCR	59
3.2.6 Secuenciación	60
3.2.7 Dendograma o árbol filogenético	60
3.3 Pruebas de patogenicidad inducida en planta de arándano	60
3.4 Resultados	61
3.5 Discusión	66
3.6 Conclusiones.....	67
CAPÍTULO 4. LITERATURA CITADA.....	67
Índice de cuadros.....	¡Error! Marcador no definido.

Índice de figuras

FIGURA 1: PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE ARÁNDANO (<i>VACCINIUM CORYMBOSUM</i> L) EN MÉXICO (SIAP, 2023), IMAGEN TOMADA DE PANORAMA AGROALIMENTARIO (2024).	10
FIGURA 2: PLANTA DE ARÁNDANO: A) CORONA DE LA PLANTA Y B) RAMA O CAÑA DE ARÁNDANO.	12
FIGURA 3: HOJAS DE ARÁNDANO: A) DISPOSICIÓN DE HOJAS EN RAMA (OPUESTAS); B) PEDICELO CORTO Y C) MÁRGENES SERRULADAS.	13
FIGURA 4: DIVERSIDAD DE TONALIDADES DE FLORES DE ARÁNDANO.	13
FIGURA 5: BAYA O DRUPA ESFÉRICA TÍPICA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ARÁNDANO. IMAGEN TOMADA Y MODIFICADA DE HERBARIO DHARMA.	14
FIGURA 6: TIPOS DE ARÁNDANO A) ARÁNDANO AZUL (<i>VACCINIUM CORIMBOSUM</i>); B) ARÁNDANO NEGRO/ARÁNDANO ULIGINOSO (<i>VACCINIUM MYRTILLUS</i>) Y C) ARÁNDANO ROJO (<i>VACCINIUM VITIS- IDAEA</i>).	15
FIGURA 7: FRUTOS MADUROS E INMADUROS DE ARÁNDANO VARIEDAD BILOXI.	18
FIGURA 8: DIFERENTES ÁNGULOS DE PODA EN ARÁNDANO; A) CORTE HORIZONTAL NO RECOMENDADO; B) CORTE CON ALTURA Y ÁNGULO DE 45° IDEAL; C) CORTE INADECUADO Y POCO RECOMENDABLE Y C) CORTE CON BUEN ÁNGULO, PERO MUY CERCANO A LA YEMA (SMEAP,2023)	21
FIGURA 9: ANTRACNOSIS DEL ARÁNDANO; A) LA FRUTA NO DESARROLLA SÍNTOMAS HASTA QUE ESTÉN MADUROS (AZUL); B) MASAS DE ESPORAS DE COLOR NARANJA BRILLANTE SE PRODUCEN DENTRO DE ÁREAS ARRUGADAS Y HUNDIDAS EN LA SUPERFICIE DE LA FRUTA Y C) MASAS DE ESPORAS SOBRE RAMILLA CON BROTE. TOMADO Y MODIFICADO DE WHARTON Y DIÉGUEZ, 2004.	24
FIGURA 10: SÍNTOMAS INDUCIDOS POR BOTRYTIS EN EL CULTIVO DE ARÁNDANO: A) MARCHITEZ EN JÓVENES; B) NECROSIS EN FLORES Y FRUTOS JÓVENES; C) LESIONES EN FRUTOS MADUROS.	25
FIGURA 11: SÍNTOMAS EN EL CULTIVO DE ARÁNDANO POR LA INFECCIÓN DE CHONDROSTEREUM PURPUREUM. A) HOJAS COLOR PLOMIZO; B) NECROSIS EN CENTRO DE LOS TALLOS; C) DAÑO EN FRUTOS.	27
FIGURA 12: CICLO DE VIDA DE LASIODIPLDIA SP. TOMADO Y ADAPTADO DE: BRAGARD ET AL., 2023; HTTPS://DOI.ORG/10.2903/SP.EFSA.2023.7737	30

FIGURA 13: MAPA DE ZONA DE MUESTREO.	38
FIGURA 14: TASA DE CRECIMIENTO RADIAL; A) INICIO DE MEDICIONES; B) AVANCE DE CRECIMIENTO Y C) PLACA COLONIZADA POR COMPLETO.	40
FIGURA 15: TRATAMIENTOS EVALUADOS, ÁNGULOS DE PODA, TESTIGO Y TOTAL DE INDIVIDUOS POR TRATAMIENTO.	43
FIGURA 16: AISLADO DE ALTERNARIA SP. EN MEDIO PDA, A) ANVERSO DE LA COLONIA DONDE SE APRECIAN ANILLOS CONCÉNTRICOS; B) REVERSO Y C) CONIDIO.	44
FIGURA 17: AISLADO DE FUSARIUM SP. EN MEDIO PDA; A) ANVERSO DE LA COLONIA CON TONALIDADES ROSÁCEAS; B) REVERSO Y C) CONIDIOS.	44
FIGURA 18: AISLADO DE PESTALOTIA SP. EN MEDIO PDA, A) ANVERSO DE LA COLONIA CON ACÉRVULOS; B) REVERSO Y C) CONIDIOS.	45
FIGURA 19: AISLADO DE CURVULARIA SP. EN MEDIO PDA, A) ANVERSO DE LA COLONIA; B) REVERSO Y C) CONIDIOS EN CONIDIÓFORO.	45
FIGURA 20: AISLADO DE LASIODIPLDIA SP. EN MEDIO PDA; A) ANVERSO DE LA COLONIA, B) REVERSO, C) CONIDIOS MADUROS E INMADUROS Y D) PARÁFISIS.	46
FIGURA 21: AISLADO DE LASIODIPLDIA SP. EN MEDIO MEA; A) ANVERSO DE LA COLONIA, B) REVERSO, C) CONIDIOS MADUROS Y D) PARÁFISIS.	47
FIGURA 22: AISLADO DE LASIODIPLDIA SP. EN MEDIO AV8; A) ANVERSO DE LA COLONIA, B) REVERSO, C) CONIDIOS MADUROS Y D) PARÁFISIS.	47
FIGURA 23: AISLADO DE LASIODIPLDIA SP. EN MEDIO OMA; A) ANVERSO DE LA COLONIA, B) REVERSO, C) CONIDIOS MADUROS Y D) PARÁFISIS.	48
FIGURA 24: A) AISLADOS PATOGENICOS EN HOJA Y B) RADIO DE ÁREA FOLIAR AFECTADA EXPRESADO EN MILÍMETROS.	50
FIGURA 25: PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE LOS DIFERENTES AISLADOS EN VARETA.	50
FIGURA 26: LONGITUD DE LESIÓN DE LASIODIPLDIA EN VARETAS EXPRESADO EN MM, NUEVE DÍAS DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN.	51
FIGURA 27: PRESENCIA DE SÍNTOMAS DE MUERTE DESCENDENTE AL EVALUAR IN PLANTA DOS TÉCNICAS DE PODA Y TRES DE SELLADO.	52
FIGURA 28: EXTRACCIÓN DE ADN DE ACUERDO CON EL PROTOCOLO CTAB KIT DE EXTRACCIÓN BASADO EN CTAB SYNERGY™ 2.0, CUANTIFICACIÓN, AMPLIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA.	59

- FIGURA 29:** GEL DE ELECTROFORESIS EN AGAROSA AL 1.5 % CON AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS DE LASIODIPLDIA SP. PARA ITS 550 PB. CARRIL 5 A 10 Y BETA TUBULINA CARRIL 12-17 PARA BETA TUBULINA: CARRIL 18 CONTROL NEGATIVO. MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1KB. 62
- FIGURA 30:** GEL DE ELECTROFORESIS EN AGAROSA AL 0.8 % CON AMPLIFICACIÓN DE MUESTRAS DE LASIODIPLDIA SP. PARA EF 550 PB. CARRIL 2 A 7 Y CARRIL 8 CONTROL NEGATIVO. MARCADOR DE PESO MOLECULAR 1KB. 62
- FIGURA 31:** EL SUPER ÁRBOL INFERIDO A PARTIR DEL **MÉTODO HEURISTICO** DE LAS SECUENCIAS PARA LA REGIÓN COMPLETA DE ITS; LAS SECUENCIAS PARCIALES DE EF1 Y EL GEN DE LA B-TUBULINA, PARA LOS AISLADOS LOS M-112, M-121, M-131, M-154, M-157 Y M-512 SE AGRUPARON JUNTO CON LA SECUENCIA TIPO PARA L. SUBGLOBOSA, CON UN SOPORTE BOOTSTRAP DEL 90%, LO CUAL CONCUERDA CON LA DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE ESTOS AISLADOS. 64
- FIGURA 32:** A) SÍNTOMAS DE MUERTE DESCENDENTE DEL ARÁNDANO A PARTIR DE INFECCIÓN NATURAL EN CAMPO; B) TALLO RECIÉN INOCULADO; C) TALLO INOCULADO CON SÍNTOMA, CARACTERÍSTICO DE MUERTE DESCENDENTE, CAUSADOS POR LASIODIPLDIA SUBGLOBOSA (AISLADO M-112) Y D) TALLO ASINTOMÁTICO DE TRATAMIENTO CONTROL. 65

Índice de cuadros

CUADRO 1: VALORES INDICATIVOS DE PUREZA EN MUESTRA DE ADN, TOMADO DE: PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN HTTP://PROGRAMA-CONTROL-CALIDAD-MUESTRAS.PDF (BANCOADN.ORG).....	31
CUADRO 2: LOCALIDADES Y GEORREFERENCIA DE LOS SITIOS DE RECOLECCIÓN EN LOS MUNICIPIOS DE EL FUERTE, AHOME Y GUASAVE.....	38
CUADRO 3: CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE CONIDIOS DE SEIS AISLADOS DE LASIODIPODIA SUBGLOBOSA OBTENIDOS DE ARÁNDANO VARIEDAD BILOXI DESARROLLADAS EN CUATRO MEDIOS DE CULTIVO DIFERENTES.....	48
CUADRO 4: EFECTO DE CUATRO MEDIOS DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO MICELIAL DE SEIS AISLADOS DE LASISODIPLDIA SUBGLOBOSA A 25 °C CON FOTOPERIODOS DE 12 H DE LUZ Y 12 H DE OSCURIDAD.	49
CUADRO 5: LECTURAS DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA (260/280 Y 260/230) DE ADN EXTRAÍDO POR EL MÉTODO CTAB.....	61
CUADRO 6: CUANTIFICACIÓN DE PUREZA FINAL DE PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS PARA ENVIAR A SECUENCIACIÓN.....	63
CUADRO 7: CONCENTRACIÓN FINAL DE PRODUCTOS DE PCR PURIFICADOS PARA ENVIAR A SECUENCIACIÓN.	63
CUADRO 8: LONGITUD MEDIA DE LA LESIÓN EN MILÍMETROS SOBRE TALLOS DE ARÁNDANO VARIEDAD BILOXI INOCULADAS CON AISLADOS DE LASIODIPLDIA SUBGLOBOSA.	65

RESUMEN

En años recientes el arándano, se ha convertido en un cultivo de gran importancia a nivel mundial, por su incremento en producción y su consumo, a pesar de factores climáticos adversos, escasos de mano de obra y costos de producción. Con el incremento en la superficie del cultivo, se han incrementado las enfermedades fungosas que afectan tanto calidad como producción. La muerte descendente del arándano, se presenta en todas las regiones donde se cultiva esta frutilla, propagándose con rapidez, a partir de la poda, actividad que se realiza después del trasplante y concluida la cosecha, con el fin de mantener la calidad del fruto y prolongar la longevidad de las plantas. En Sinaloa, esta enfermedad representa una limitante para la producción de este cultivo, debido a la tecnificación y densidades de siembra, lo que incrementa los costos de producción, ya que su presencia por lo común causa la muerte de la planta cuando alcanza la corona, y causa mermas en la producción e incremento de costos. El presente trabajo se realizó con el objetivo de identificar al agente causal de la muerte descendente del arándano, verificar su patogenicidad, su incidencia posterior a la poda y el tipo de sellado. Para esto se recolectaron tallos con síntomas típicos de muerte descendente en cinco lotes comerciales de arándano, en los municipios de Ahome, El Fuerte y Guasave en el estado de Sinaloa, donde se obtuvieron 173 aislados fúngicos, identificados por morfología y ubicándose en cinco géneros relacionados con dicho síntoma: *Alternaria*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotia* y *Curvularia*. Los resultados de la patogenicidad colocan a los aislados de *Lasiodiplodia* como agente causal de la muerte descendente del arándano, confirmándose los postulados de Koch por el reaislamiento de los aislados de origen. En las evaluaciones de poda y sellado, el mejor resultado fue con el ángulo de poda de 45° y 180° sellados con pintura vinílica tipo plástico lavable más oxiclورو de cobre. El análisis filogenético de los espaciadores internos transcritos (ITS), β -tubulina (*tub2*) y los fragmentos de genes del factor de elongación de la traducción 1- α (*TEF*), consiguió la identificación de *Lasiodiplodia subglobosa* como la especie asociada a la muerte descendente del arándano, la cual fue patogénica en arándano variedad Biloxi, con diferentes grados de virulencia. Los resultados del presente trabajo, abren nuevas líneas de investigación respecto al impacto sobre otras variedades de arándano, así

como su impacto en calidad y rendimiento a nivel local aunado a la posible afección de *L. subglobosa* hacia otros cultivos de importancia económica en la región.

Palabras clave: Arándano, muerte descendente, *Lasiodiplodia*

ABSTRACT

In recent years, blueberries have become a crop of great importance worldwide, due to its increased production and consumption, despite adverse weather factors, labor shortages and production costs. With the increase in the area of cultivation, fungal diseases have increased, affecting both quality and production. Blueberry dieback occurs in all regions where this fruit is grown, spreading rapidly from pruning, an activity that is carried out after transplanting and after the harvest, in order to maintain the quality of the fruit and prolong the longevity of the plants. In Sinaloa, this disease represents a limitation for the production of this crop, due to the technological development and planting densities, which increases production costs, since its presence usually causes the death of the plant when it reaches the crown, and causes losses in production and increased costs. .This work was carried out with the aim of identifying the causal agent of blueberry dieback, verifying its pathogenicity, its incidence after pruning and the type of sealing. For this purpose, stems with typical symptoms of dieback were collected from five commercial blueberry plots in the municipalities of Ahome, El Fuerte and Guasave in the state of Sinaloa, where 173 fungal isolates were obtained, identified by morphology and located in five genera related to this symptom: *Alternaria*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotia* and *Curvularia*. The results of the pathogenicity place the *Lasiodiplodia* isolates as the causal agent of blueberry dieback, confirming Koch's postulates by the re-isolation of the original isolates. In the pruning and sealing evaluations, the best result was with the pruning angle of 45° and 180° sealed with washable plastic-type vinyl paint plus copper oxychloride. In the pruning and sealing evaluations, the best result was obtained with the pruning angle of 45° and 180° sealed with washable plastic-type vinyl paint plus copper oxychloride. The phylogenetic analysis of the internal transcribed spacers (ITS), β -tubulin (tub2) and the gene fragments of the translation elongation factor 1- α (TEF), led to the identification of *Lasiodiplodia subglobosa* as the species associated with blueberry dieback, which was pathogenic in blueberry variety Biloxi, with different degrees of virulence. The results of this work open new lines of research regarding the impact on other blueberry varieties, as well as its impact on quality and yield at a local

level, in addition to the possible affectation of *L. subglobosa* towards other crops of economic importance in the region.

Keywords: Blueberry, dieback, *Lasiodiplodia*.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 INTRODUCCIÓN

El arándano (*Vaccinium* sp.) es un arbusto de la familia Ericaceae, con amplia distribución en Norteamérica, Europa Central y Eurasia, encontrándose también en

América del Sur, y unas pocas especies en África y Madagascar. Esta familia incluye cuatro subfamilias, que se caracterizan por crecer de forma silvestre en su mayoría en zonas frías (Rubio *et al.*, 2010).

El género *Vaccinium*, se ubica dentro de la subfamilia Vaccinioideae, la cual contiene al subgénero *Cyanococcus* o arándano verdadero con cerca de 400 especies, en su mayoría nativas de Asia y 26 de Norteamérica, donde destacan los whortleberries, deerberries, bilberries, sparkleberries, cranberries, lingonberries y blueberries; estos últimos de gran importancia comercial en el sector frutícola con las siguientes variedades: *V. corimbosum* L., cerca del 80%, seguido en importancia por *V. ashei* Reade, con un 15%, y el 5% restante entre *V. angustifolium* Aiton y algunos híbridos de *V. angustifolium* x *V. corymbosum*. El arándano se ha posicionado en el mundo como una de las frutas más apetecidas y es aquí en donde radica la importancia de mantener una producción constante. De acuerdo con lo reportado por la USHBC (2023), los principales países productores son: China, Estados Unidos, Perú, Canadá, Chile, España, México y Polonia, que aportan 1,639,397.68 t, equivalentes al 88% de la producción mundial. Por su parte, México aportó el 4.9% (80,133.49 t) en 2023; dicho volumen se concentra en los siguientes cinco estados: Jalisco (28,120.5 t), Sinaloa (26,633.68 t), Michoacán (12,109.64), Baja California (5,589.5 t) y Guanajuato (3,670.4 t) de acuerdo con el SIAP (2023), que en suma equivale al 95% de la producción nacional, sin embargo, Sinaloa ocupa el cuarto lugar en cuanto a rendimiento con un promedio de 13.36 t ha⁻¹, que lo posiciona debajo de la media nacional, la cual es de 13.46 t ha⁻¹ (SIAP, 2023).

Así mismo, por las características particulares de los sistemas de producción y las densidades de plantación, predisponen e incrementan la susceptibilidad de este cultivo a enfermedades fúngicas, lo que limita la calidad y los volúmenes de producción. La poda es una práctica constante en el manejo del arándano, esta se realiza de manera inmediata al trasplante y posterior a la cosecha, repitiéndose esta actividad con una periodicidad de 250 días (González-Maldonado, 2014).

La muerte descendente, se presenta una vez que el arándano se ha establecido en el campo y posterior a las podas, por lo que se infiere que su propagación puede estar

relacionada con técnicas de inadecuadas durante esta labor cultural, por lo que es conveniente realizar una correcta identificación y un buen diagnóstico para establecer programas de manejo de la misma, ya que hoy en día no se dispone de tratamientos convencionales efectivos para su manejo. El objetivo del presente trabajo fue identificar de forma morfológica y filogenética, el complejo de los hongos asociados a la muerte descendente del arándano y el reconocimiento de su grado de patogenicidad, así como evaluar *in planta* dos técnicas de poda y sellado, utilizadas en la región.

1.2 REVISION DE LITERATURA

1.2.1 Origen del arándano

El arándano es una baya originaria del hemisferio norte, de las zonas septentrionales de Europa, Norteamérica y Asia, donde crece en forma silvestre. Este fruto pertenece al grupo de los berries, también conocidos como bayas o frutas del bosque, son un

tipo de frutas pequeñas y comestibles que en sus orígenes no se cultivaban, sino que eran recolectados en arbustos silvestres. Los arándanos pertenecen al género *Vaccinium* de la familia Ericaceae, y por lo general se cultivan dos tipos de arándano: Lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Aiton) que comprende las especies más pequeñas y Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) que abarca los arbustos más grandes, dentro de los cuales se encuentran muchas variedades comerciales (Romero, 2016). El género *Vaccinium* lo constituyen cerca 30 especies, de las cuales solo unas cuantas son las más comercializadas. *V. corimbosum* representa cerca del 80% del total de la superficie cultivada en el mundo, seguido de *V. ashei* Reade con un 15% de la producción (García *et al.*, 2014).

Se sabe que los arándanos han sido cosechados durante cientos de años por los nativos norteamericanos antes de que llegaran los peregrinos. Estos nativos quemaban zonas de vegetación, donde crecían las bayas de arándano, para regenerar el vigor de las cosechas y eliminar la competencia. Las tribus Narragansetts y Wampanoag recogían las bayas silvestres para su consumo en una comida concentrada y nutritiva denominada Pemmican. Platillo que se hacía con carne y grasa. Los colonos europeos incluyeron estas bayas en su alimentación, preparaban salsa de arándanos el día de acción de gracias "Thanksgiving". La domesticación del arándano, inicia con las primeras selecciones de arbustos y con los primeros trasplantes de plantas silvestres a tierras cultivadas dando el primer paso de su domesticación en el Smithsonian Institution de Washington en 1830, más adelante en 1893, se estableció otra gran plantación en Michigan. Debido a que eran muy abundantes en los bosques no se hicieron esfuerzos por desarrollar nuevas variedades hasta 1906 (Quintanilla *et al.*, 2016).

Los primeros intentos de selección desde el medio silvestre los realizó Frederick Coville a partir de 1911, quien realizó mejoras notables a través de cruzamiento y posterior selección de las progenies obtenidas. De igual manera, la información proporcionada por Antón Gass sentó las bases para investigaciones posteriores, dando como resultado 30 variedades disponibles para plantar en 1960, las cuales se utilizan en la actualidad (Rodríguez-Belmonte, 2017). Mas tarde, se sumaron varias universidades de EE.UU. y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), formándose una red que contribuyó a extender de manera comercial el cultivo de

arándano y su adaptación a diferentes ambientes (suelo y clima), a la vez que se incrementaba su productividad y calidad de fruto (Undurraga y Vargas, 2013). El arándano fue introducido a México en 1996, y desde ahí en adelante experimentó un crecimiento casi exponencial, ya que en la última década se estima en un 800% debido a la demanda mundial del producto. Hoy en día, el arándano ha traspasado las fronteras de su lugar de origen y se cultiva en otras regiones del mundo: Europa, Sudamérica, Australia y Nueva Zelanda, China y Japón (González *et al.*, 2019).

Los arándanos, son bayas de color oscuro, azuladas o rojizas, ricas en antocianinas, carotenoides y minerales, que le confieren excelentes cualidades nutricionales, medicinales y antioxidantes; aportan diversos beneficios para la salud, pues ayudan a cuidar del corazón, controlar la diabetes, mejorar el deterioro cognitivo y la memoria. Estas frutas son de bajo valor calórico, ricas en vitamina C, potasio, hierro y calcio, necesario para la transmitir y generar el impulso nervioso, para la actividad muscular normal e intervienen en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. Constituyen una buena fuente de fibra que mejora el tránsito intestinal. También contiene taninos que le confieren propiedades astringentes y la mayor propiedad de esta fruta son sus altos contenidos de antocianinas y vitaminas que intervienen en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones (Ostrolucka *et al.*, 2007).

En especial las antocianinas, les proporcionan su característico color azul oscuro; estos compuestos ayudan a combatir los radicales libres, responsables del envejecimiento celular y del desarrollo de enfermedades crónicas, como el cáncer o enfermedades cardiovasculares, al reducir el colesterol LDL (colesterol malo) y aumentar el colesterol HDL (colesterol bueno). Además, también ayudan a reducir la presión arterial y a mejorar la elasticidad de los vasos sanguíneos. Los arándanos tienen propiedades antiinflamatorias debido a su contenido en antocianinas y otros compuestos bioactivos. Esto puede ser beneficioso para prevenir y reducir la inflamación crónica en el cuerpo, que está relacionada con enfermedades como la diabetes tipo 2 y la obesidad. También pueden ser útiles para mejorar la función cerebral y prevenir el deterioro cognitivo relacionado con la edad. Se ha demostrado que el consumo regular de arándanos mejora la memoria, la atención y el aprendizaje en adultos mayores; pueden tener un efecto probiótico al estimular el crecimiento de

bacterias benéficas en el intestino, lo que contribuye a un microbioma intestinal saludable; contienen compuestos llamados proantocianidinas, que pueden evitar que las bacterias se adhieran a las paredes del tracto urinario, lo cual reduce el riesgo de infecciones como la cistitis. Estas frutas contienen vitamina C y luteína, que pueden proteger nuestros ojos del daño oxidativo y prevenir enfermedades oculares como las cataratas y la degeneración macular relacionada con la edad. Los arándanos son bajos en calorías y ricos en nutrientes esenciales, como vitamina C, vitamina K, manganeso y fibra. Por lo tanto, son una excelente opción para incluir en nuestra dieta sin aumentar de forma significativa la ingesta calórica, por tanto, se han considerado en los últimos años dentro de la nueva categoría de alimentos funcionales, llamados superfrutas, lo cual ha sido un factor para el incremento de su producción y comercialización a nivel mundial, lo que ha planteado nuevos desafíos a la adaptación y nuevos métodos de cultivo (González *et al.*, 2019).

1.2.2 Distribución

La familia Ericaceae, se encuentra distribuida por Norteamérica, Europa Central y Eurasia, encontrándose también en América del Sur, y unas pocas especies en África y Madagascar. Ericaceae incluye cuatro subfamilias, que se caracterizan por crecer de forma silvestre en su mayoría en zonas frías (Rubio *et al.*, 2010). En México, su distribución geográfica abarca varios estados de la costa del Pacífico, los más importantes en cuanto a producción son: Jalisco, Michoacán, Sinaloa, Baja California y Colima, y en el centro del país, Guanajuato y Puebla (Figura 1) (SIAP, 2023).

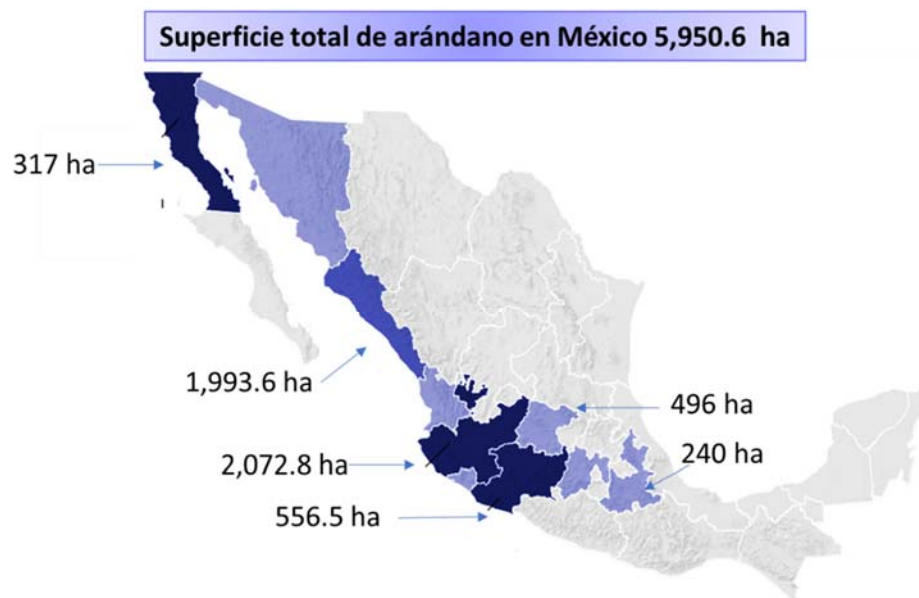


Figura 1: Principales estados productores de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en México (SIAP, 2023), imagen tomada de panorama agroalimentario (2024).

1.2.3 Clasificación taxonómica del arándano

El género *Vaccinium* L. es complejo, se divide en más de cuarenta especies como *V. oxycoccos* L., denominada como el “verdadero arándano” y referida también en la bibliografía como *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) (Garrido y Perez-Urria, 2014).

Clasificación taxonómica del arándano azul (NCBI, 2023):

Superreino: Eucariota

Reino: Viridiplantae

Filo: Estreptofita

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Género: *Vaccinium*

Especie: *Vaccinium corymbosum*

1.2.4 Descripción y ecología de las ericáceas

Las especies de Ericaceae se caracterizan por ser arbustos erectos o rastreros, subarbustos o árboles pequeños, con altura variable según la especie (0.3 a 7.0 m),

presentan pubescencia múltiple, en algunos casos glandulares. Por su tipo de crecimiento se separa en arándanos highbush o altos (de mayor importancia económica) y lowbush o bajos. En condiciones de cultivo puede alcanzar una altura de 2.5 m. La coloración roja-púrpura-azul de los arándanos se atribuye en gran medida a las antocianinas que se encuentran en los arándanos. Las antocianinas, conocidas por su potente actividad biológica como antioxidantes, tienen una importante implicación en la profilaxis del cáncer u otras enfermedades, incluidas las de origen metabólico (Luteyn *et al.*, 1995; Smith., 2004; Kopystecka *et al.*, 2023).

1.2.4.1 Descripción morfológica del arándano.

El sistema radical de la familia Ericaceae es inusual, por ser de un grado fino y tener asociación simbiótica con hongos ericoides. Posee un sistema radical sin pelos absorbentes y se encuentra adaptado a suelos de bajo pH. Este es superficial, situándose el 80% en los primeros 40 cm, tiene raíces finas y fibrosas donde las encargadas de la absorción son las raíces jóvenes, por lo que en este sistema de absorción de la planta se puede ver en algunos casos déficit de nutrición, lo cual suele asociarse con hongos formadores de micorrizas. Este sistema radicular permite a la planta vivir y desarrollarse en suelos húmedos y pantanosos. Entre las raíces y la parte aérea se encuentra la corona, que tiene la capacidad de emitir brotes (Valenzuela-Estrada *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2010; Garrido y Perez-Urria, 2014).

El arándano es un arbusto compuesto por muchas ramas que surgen de las yemas localizadas en la corona de la planta. La corona (Figura 2) es el área de transición entre la parte aérea y la raíz. Las ramas que emergen de la corona se denominan “cañas”, las mismas se forman en la primavera y en el año siguiente se lignifican y producen fruta. En primavera inicia la brotación y la formación de las ramas y en el otoño-invierno siguiente estas cañas son de color amarillo, rojo o marrón y tienen una corteza de aspecto suave. Las cañas de mayor edad son de mayor diámetro, leñosas, con corteza de aspecto rugoso y de color gris a marrón claro (Gough, 1989).



Figura 2: Planta de arándano: A) Corona de la planta y B) rama o caña de arándano.

Las yemas se ubican en las axilas de las hojas y al principio del desarrollo son yemas vegetativas que se convertirán luego en reproductivas, en relación con la longitud del día, temperatura y condición de la planta (Williamson et al., 2004). Las yemas florales se ubican en las últimas dos brotaciones, en la parte apical de las plantas (Kovaleski et al., 2015). Las yemas reproductivas son redondas y en algunas variedades podemos encontrar yemas múltiples en cada axila de hoja. En general las variedades highbush tienen entre 5 a 10 yemas reproductivas por rama, mientras que las variedades rabbiteye pueden formar mayor cantidad de yemas en sus ramas. Las yemas vegetativas son de forma aplanada y alargada, y se ubican en la parte basal de la rama (Wilbur et al., 1978; Smith, 2004).

La mayoría de los cultivares de arándanos tienen hojas caducas, presentan un color verde claro en la cara abaxial (envés) y verde más oscuro en la cara adaxial (haz). En invierno cambian su coloración de verde a amarillo, rojo o violeta, que difiere de acuerdo con la variedad y la intensidad de coloración que adquieren se relaciona a la cantidad de horas de frío acumuladas. Cuando los inviernos son intensos se produce la caída total de las hojas. En las nuevas variedades de bajo requerimiento de frío las hojas pueden persistir durante el invierno y se realiza un manejo “evergreen” o siempre verde del cultivo. Las hojas son simples, alternas y raras veces sub-opuestas, cortamente pediceladas, desde coriáceas y persistentes, hasta membranosas y caducas; forma elíptico-lanceoladas de unos 5 a 7 cm de longitud, márgenes enteros, algunas veces serruladas-crenadas (Figura 3), la venación puede ser pinnada o penninervada; sus nodos presentan solo una unión, de un color verde pálido a muy

intenso según cultivares, algunas adquieren una coloración rojiza en el otoño (Wilbur *et al.*, 1978; Smith, 2004).

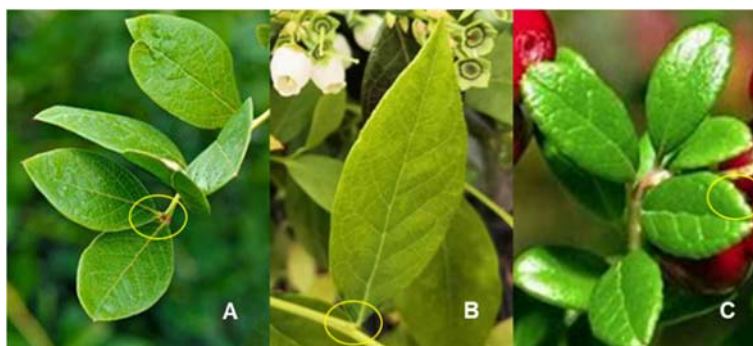


Figura 3: Hojas de arándano: A) disposición de hojas en rama (opuestas); B) pedicelo corto y C) márgenes serruladas.

Presenta inflorescencias axilares o terminales, en racimos de 6 a 10 en cada yema (Figura 4), paniculadas o en flores solitarias; pedicelos bibracteolados con brácteas desde caducas a persistentes (Wilbur *et al.*, 1978; Smith, 2004). Las flores son bisexuales, actinomorfas o en algunos casos zigomorfas y unisexuales; sépalos indistintos con relación al cáliz, de 4 a 5 lóbulos, algunas veces persistentes, valvados, imbricados o reduplicados; corola simpétala rara vez polipétala, membranosa a carnosa, cilíndrica, campanulada o urceolada; hipanto algunas veces presente, angulado o alado; estambres 8 a 14, en su mayoría 10 con dehiscencia introrsa y longitudinal; los granos de polen son tetrados; pistilo y estilo huecos, el ovario es supero o ínfero, presenta de 4 a 5 carpelos; estigma simple, en ocasiones lobulado, placentación axilar raramente parietal por encima de la placenta; los óvulos son numerosos o rara vez solitario con tegumento simple (Wilbur *et al.*, 1978; Smith, 2004; Luteyn, 2005).



Figura 4: Diversidad de tonalidades de flores de arándano.

El fruto puede presentarse en cápsula, baya o drupa esférica (Figura 5) de 1 a 3 cm de diámetro, cáliz persistente, carnoso o acrecenté, semillas de 1–1.5 mm de largo, en general numerosas, suelen ser pequeñas y aladas, con una fina capa de células elongadas o isodiamétricas, con endospermo carnoso y embrión recto, por lo común de color verde (Wilbur *et al.*, 1978; Smith, 2004; Luteyn, 2005).



Figura 5: Baya o drupa esférica típica de los diferentes tipos de arándano. Imagen tomada y modificada de herbario Dharma.

Los frutos, a medida que maduran, pasan por distintos grados de color, tornándose azul característico al finalizar la maduración. A su vez, la epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas, que le dan una terminación muy atractiva. Los frutos más cercanos a las ramas son más grandes que los distales, y su tamaño se ha relacionado también con el vigor de la rama, es decir, ramas más vigorosas producen frutos mayores. Además, los primeros frutos maduros de un cultivar a menudo son mayores que los que se recogen más tarde (Wilbur *et al.*, 1978; Smith, 2004).

1.2.4.2 Tipos de Arándanos

Arándano Azul (*Vaccinium corimbosum*), crece en la zona noreste de EE. UU., se caracteriza por sus hojas caducas, que adquieren un tono escarlata (Figura 6A), al llegar el otoño, es un arbusto de aspecto vertical, que alcanza 1.8 m de altura, con flores e inflorescencias péndulas de color rosa pálido. Destaca por sus frutos de color negro – azulado, bastantes grandes y sabrosos, es la especie más cultivada. Los arándanos son reconocidos por su contribución a una dieta saludable con diferentes compuestos bioactivos beneficiosos como flavonoides, antocianinas y otros (Concha-Meyer *et al.*, 2015; Romero, 2016).

Arándano Negro / Arándano Uliginoso (*Vaccinium myrtillus*) conocido como arándano de pantano. Se encuentra en el hemisferio norte. Muy abundante en el nivel del mar, en regiones más frías de Europa, Asia y América, hasta más de 3000 metros en las montañas del sur de estas regiones. Se trata de un arbusto que mide máximo medio

metro, en promedio de 15 a 20 cm de altura, crece en suelos ácidos de la tundra, zonas pantanosas y bosques de coníferas (pinos). Sus frutos son negros con pulpa blanca (Figura 6B) y sus flores rosa pálido, florece en primavera y fructifica en verano. No se suele cultivar, aunque se recogen los frutos en forma silvestre. El arándano es la baya silvestre de mayor importancia económica en el norte de Europa, y es empleado en la producción de jugos y alimentos. Debido a su actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y reductora de la apoptosis, tanto los arándanos de pantano como los arándanos se pueden usar como suplemento dietético con acciones anti-radicales libres en la prevención de enfermedades cancerosas y cataratas, o como componente de preparaciones de protección solar (Romero, 2016; Kopystecka *et al.*, 2023).

Arándano Rojo (*Vaccinium vitis – idaea*), es otro tipo de arándano cuyos frutos suelen recogerse de las plantas silvestres. Crece en la zona norte de Europa, América, Asia y en las montañas del hemisferio norte. Por lo común, forma un bulto por debajo de los árboles de 10 y 30 cm de altura, aunque es muy similar al ráspano, se diferencian porque las flores de este último son rosadas, mientras que del arándano presenta tonos rosados y estambres incluidos dentro de la corola. Los frutos son redondeados y rojizos (Figura 6C), aparecen a finales de otoño, su sabor es muy ácido, por lo que se utiliza en la elaboración de compotas y mermeladas (Romero, 2016).



Figura 6: Tipos de arándano A) arándano azul (*Vaccinium corimbosum*); B) arándano negro/arándano uliginoso (*Vaccinium myrtillus*) y C) arándano rojo (*Vaccinium vitis- idaea*)

1.2.5 Generalidades del cultivo

El arándano es un fruto originario del hemisferio norte, durante décadas los habitantes de esta zona del planeta se acostumbraron a degustar los arándanos de las plantas silvestres que crecían en los diferentes bosques de la región. De esta manera con el tiempo se creó una fuerte tradición de su consumo en las más diversas preparaciones.

El blueberry, arándano o mirtillo tiene la piel tersa, su pulpa es jugosa y aromática de sabor agridulce (Bernal, 2010).

Esta familia se puede encontrar cerca de deslizamientos de tierra, quemas o volcanes en actividad; su principal polinizador son las aves y la dispersión de las semillas se realiza por pequeños mamíferos o aves. En condiciones de cultivo puede alcanzar una altura de 2.5 m. Para su mejoramiento genético se ha cruzado con otras especies con el fin de poder adaptar su cultivo a distintas zonas climáticas, por lo que, en la actualidad, se tienen cultivares con requerimientos que varían en un rango de 100 a 1,200 horas frío (Smith, 2004).

El crecimiento vegetativo se da en cuatro etapas, en donde el primero es la yema vegetativa, el segundo es el brote caracterizado por entrenudos cortos, tercero el alargamiento de los entrenudos y la expansión de hojas y cuarto una rama nueva conformada por las hojas extendidas en su totalidad y entrenudos largos (Mesa, 2015).

1.2.6 Requerimientos del cultivo:

El sistema radical de los arándanos se caracteriza por ser fino y fibroso por lo cual no es capaz de atravesar estructuras compactas, por esto requiere de suelos sueltos y bien drenados, con un contenido de materia orgánica del 3% al 5% (Undurraga *et al.*, 2013). Por lo general, esta especie crece en suelos con un pH de 4.5 a 5.2 en suelos arenosos. Este género tiene una característica importante, la cual consiste en que en climas fríos la profundidad del suelo puede ser mínima, en cambio en climas calurosos si esta es muy superficial las plantas pueden morir. Es recomendable hacer buenos drenajes en las primeras etapas de desarrollo, para conseguir que en los primeros 40 cm de profundidad no existan excesos de humedad (Asagrin, 2007).

La materia orgánica, como ya es conocido, cumple diversas funciones en un ciclo productivo, ayuda a la retención de humedad, reduce la lixiviación de los nutrientes que pueden quedar retenidos en el suelo, también puede promover la energía para algunos de los microorganismos benéficos para la planta, y como es el caso de la mayoría de los suelos arenosos esta puede ayudar a retener macronutrientes como potasio, calcio, magnesio y mantiene el nitrógeno en forma de amonio el cual es la forma en que la planta lo asimila más fácil. Debido a que las raíces de los arándanos son limitadas en su crecimiento hacia abajo, por la disponibilidad de la materia

orgánica, el desarrollo y crecimiento de la planta presentan una proporción directa a la cantidad de materia orgánica disponible en el suelo (Undurraga *et al.*, 2013). Los suelos más recomendables para esta especie son ubicados en praderas, en lo posible que no tengan restos de herbicidas y exceso de calcio (Rubio *et al.*, 2010).

El arándano se caracteriza por ser uno de los cultivos que puede soportar bajas temperaturas con un aproximado de 400 a 1000 horas frío, sin generar grandes daños morfológicos y por ende productivos, caso contrario ocurre cuando las temperaturas son muy altas (28°-30°C) las cuales pueden ocasionar efectos negativos como quemaduras en las hojas (Rubio *et al.*, 2010), disminución en el sabor y firmeza de la fruta (Undurraga *et al.*, 2013).

También se debe tener en cuenta que vientos muy fuertes en los primeros estadíos de la planta pueden afectar su crecimiento, lo que causa daños en el follaje, floración y polinización (Rubio *et al.*, 2010).

La cantidad de agua necesaria está determinada en su mayoría por su disposición radicular ya que éstas, son superficiales, con poca profundidad sensibles a la falta o el exceso de agua en el suelo. Por lo cual, es recomendable realizar diversos análisis químicos al agua para determinar la calidad de la misma. En este cultivo se tienen en cuenta los distintos sistemas de riego, en donde el más utilizado por la mayoría de los productores es el localizado, dado que permite mantener un control y un nivel adecuado de humedad requeridos por la planta en los primeros 20 cm del suelo, donde se encuentran en su mayoría las raíces (Undurraga *et al.*, 2013).

Cuando la planta alcanza su estado de latencia puede volverse muy sensible a los grandes cambios de temperatura, sobretodo en las mínimas, por lo cual es de vital importancia tener cuidado a la hora de escoger la variedad a cultivar (Undurraga *et al.*, 2013).

1.2.7 Establecimiento del arándano como cultivo.

1.2.7.1 Selección de las variedades.

Hoy existe una gran cantidad de variedades de arándanos a disposición del productor, esto nos brinda un extenso portafolio de las mismas, lo que hace indispensable tener en cuenta factores técnicos, climáticos y edáficos que nos ayuden a seleccionar la

variedad que más se ajuste a nuestras condiciones por región, así como las exigencias del mercado. Es por ello que, previo a la elección de éstas, es imprescindible desarrollar un estudio de zonificación edafoclimática del área específica de plantación, por lo que es importante realizar un análisis de variables como: acumulación de horas frío, grados días, riesgo de heladas y precipitaciones, en especial en las épocas de floración y cuajado del fruto. Del mismo modo, estudio de los suelos, en cuanto a profundidad, textura y condición química. También debe considerarse la productividad, calidad y capacidad viajera de las variedades, según el mercado destino. De esta manera, una variedad para consumo en fresco debe tener alto rendimiento, floración y cosecha concentrada, fruta de alto calibre y de firmeza que supere los 200 Newtons por mm², para que sea capaz de viajar largas distancias y con periodos de postcosecha de hasta 55 días. Dicha condición, si bien tiene un origen varietal muy fuerte, es dependiente del manejo agronómico del cultivo, con variables críticas como poda, nutrición, riego y manejo de *Botrytis*. Del mismo modo una característica, que cada vez cobra mayor importancia, será la intensidad de color, sabor y crocancia, que son las cualidades que conforman el aspecto de calidad (González y Morales, 2017).

1.2.7.2 Variedad Biloxi.

Planta de hábito erecto y vigorosa. Requiere un mínimo de 400 horas de frío. Es de producción temprana (Figura 7), madura justo detrás de las variedades O'Neal y Star. Florece muy temprano, por lo que puede ser afectada por heladas. Tiene fruta de mediano tamaño, de color azul claro, muy firme y de excelente sabor (González y Morales, 2017).



Figura 7: Frutos maduros e inmaduros de arándano variedad Biloxi.

1.2.7.3 Establecimiento del arándano.

Tiene un alto costo inicial, ya que requiere adecuada preparación de suelo en profundidad (en seco se logra mejor resultado), instalación de riego localizado, suelo liviano y mulch; se deben establecer plantas sanas y certificadas, de viveros registrados. Una buena planta cuenta con un sistema de raíces desarrolladas, blancas y de no más de dos años en vivero. Se recomienda confeccionar camellones (30 - 50 cm de alto y 1 m de ancho), acondicionar su textura y estructura con aserrín de pino grueso, corteza de pino, capotillo de arroz o viruta en dosis que van entre 200 a 800 m³ por hectárea o bien usar composta u otras enmiendas orgánicas que permitirán que las raíces exploren de forma libre la superficie, cubriendo los espacios con raíces. La orientación de las hileras debe ser de preferencia en dirección al viento para permitir una mejor ventilación del cultivo. La distancia entre hileras más usada es 3 m y de no más de 100 m de largo para no afectar la rápida entrega de las rejillas cosechadas; dejar el espacio suficiente en la cabecera de las hileras para la maniobra de maquinaria. La época de establecimiento puede ser en otoño o inicio de primavera, con plantas de buena calidad que garanticen origen genético y condición sanitaria. En primavera se requieren riegos pesados 2 o 3 días antes de plantar, instalar el gotero a 5 cm de la planta. La planta se debe enterrar 2 - 3 cm más profundo que la que tenía en bolsa, dado que el camellón tiende a bajar y las raíces pudiesen quedar expuestas. Se recomienda apisonar de manera suave con la mano alrededor de la planta, así se elimina el exceso de aire y se evita la compactación (Morales, 2017).

1.2.8 Poda del arándano.

La poda es una de las prácticas más importantes y recurrentes en las zonas frutícolas del mundo. En el arándano se realizan dos tipos de poda: de formación y de producción (de mantenimiento, de floración y rejuvenecimiento), en esta última se incluye la eliminación de madera vieja, improductiva o enferma. En los primeros dos años de plantación del arándano deben eliminarse las yemas florales para favorecer el desarrollo y crecimiento de brotes vegetativos vigorosos, fomentar el crecimiento de la planta, eliminar las ramas, hojas o flores dañadas, rotas o secas, que también pueden albergar parásitos y favorecer la iluminación, aireación en el tallo y mejora la floración (Pescie *et al.*, 2011).

El manejo de la carga frutal a través de la poda influye de forma considerable, en parámetros importantes en relación con la producción, calidad y condición de fruta. El arándano es una especie que tiende a sobrecargarse de fruta, pues carece de un sistema auto-regulador de carga, como ocurre en otras especies que tienen caídas naturales de fruta (duraznero tiene hasta 3 caídas naturales de autorregulación). El único mecanismo natural de atenuación de carga en arándano, es la reducción del calibre (frutos pequeños), y esta condición es insuficiente, ya que la planta se reciente en otros ámbitos como, la reducción de crecimiento de brotes, menos emisión de brotes basales y ramillas cargadoras de menor longitud. Por lo tanto, la regulación de fruta viene por el ajuste del número de yemas florales, obteniéndose un resultado en sentido inverso a la sobrecarga, con menor número de yemas florales, lo que implica menor número de bayas, cuyo efecto compensatorio es la producción de fruta de mayor calibre (González-Gálvez, 2013).

La poda de formación incluye la eliminación de madera vieja, improductiva o enferma. en los primeros dos años a partir de la plantación del arándano, además deben eliminarse las yemas florales para favorecer el desarrollo y crecimiento de brotes vegetativos vigorosos. El objetivo perseguido en la poda anual es lograr un desarrollo de brotes vigorosos que mantengan un equilibrio entre la producción de follaje y fruta, logrando fruta en cantidad y calidad, el arándano debe ser podado en invierno cuando la planta está sin hojas y las yemas están en dormancia, y se observan con facilidad (Undurraga y Vargas, 2013).

La poda de producción consiste en eliminar todos los brotes que produjeron fruta la temporada anterior, se realizan cortes sobre el brote más vigoroso del año; eliminar brotes cruzados, ramas viejas improductivas y enfermas, para dar acceso a la penetración de la luz y la aireación. Se deberán cortar desde la base todos los brotes delgados ya que producen fruta de bajo calibre. Los brotes largos que con el peso de la fruta caerán hacia el centro de la entre hilera serán despuntados sobre una yema ubicada hacia arriba. Cada variedad debe podarse según sus características de crecimiento, desarrollo y producción. De una buena o mala poda también dependerá lograr una producción exitosa. Una poda severa producirá gran crecimiento vegetativo,

poca fruta de tamaño muy grande y de baja calidad. Por otra parte, la poda suave acarreará envejecimiento prematuro (Undurraga y Vargas, 2013).

La altura de la poda, está determinada, entre otros factores, por la variedad ya que a algunas les es más difícil brotar desde la corona por lo que deben podarse a una mayor altura, en caso de las variedades como Biloxi son más propensas a brotar desde la corona en cuyo caso se podrá realizar una poda más baja (Figura 8). No son recomendables las podas a piso, la altura en las podas debe ser de al menos 25 cm, con un ideal de 35cm, con esa longitud se garantiza una cantidad suficiente de brotes y en consecuencia, una buena producción. Los cortes se tienen que hacer de forma perpendicular con un ángulo ideal de 45° . En los cortes horizontales o planos, es muy probable que las gotas de agua permanezcan en la punta del corte y se creen condiciones para la entrada de enfermedades, por otro lado, los cortes demasiado inclinados cercanos a los 80° no se recomiendan ya que desgastan las herramientas y es más pesado para el personal que lo realice. En los cortes de las ramas se recomienda evitar cortes menores a 10 cm ya que a menor altura, menor cantidad de yemas (SMEAP, 2023).

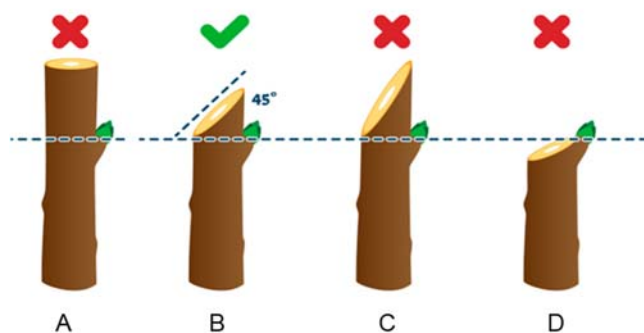


Figura 8: Diferentes ángulos de poda en arándano; A) corte horizontal no recomendado; B) corte con altura y ángulo de 45° ideal; C) corte inadecuado y poco recomendable y D) corte con buen ángulo, pero muy cercano a la yema (SMEAP, 2023)

Es de suma importancia que el personal de trabajo lleve consigo siempre su sanitizante para aplicarlo en las tijeras después de cada corte, ya que la poda es una herida de la planta que posibilita diseminar enfermedades a otras plantas.

1.2.8.1 Tipos de poda

La poda de limpieza o mantenimiento, libera espacio para que salgan nuevas ramas sanas y eliminar los elementos indeseables de la planta. Esta poda se hace junto con las otras tareas de mantenimiento durante todo el año (Pescie *et al.*, 2011).

Procedimiento: localizar los brotes secundarios o chupones, los cuales aparecen entre las primeras hojas y el tallo principal, cortar los chupones con cuidado, cortar lo más cerca del tallo principal y sin dañarlo. Lo mejor es hacerlo cuando el brote tiene menos de 5 cm. Cortar los brotes en diagonal evitará que el agua permanezca en la herida y se pudra el tejido. Remover tallos, hojas y flores secas, marchitas o enfermas y rebrotes que hayan surgido desde la raíz o rebrotes del pie de la planta que sean débiles o estén mal situados (Maticorena-Quispe y Escobedo-Álvarez, 2024).

La poda de floración, se realiza una vez al año, a finales del invierno o principios de la primavera cuando hayan pasado los fríos más intensos, y su objetivo es aumentar la floración de la planta. Los brotes que han florecido ya no volverán a hacerlo nunca más y, por tanto, hay que eliminarlos para que surjan otros nuevos. La poda de floración se puede realizar al mismo tiempo que la de limpieza. No se deben realizar cortes en los tallos que no han florecido, ya que son los que florecerán el próximo año. Es importante considerar que lo mejor para que una planta florezca fuerte y vigorosa, es un ambiente húmedo y suficiente luz (Bañados *et al.*, 2007).

Cuando la planta se hace vieja o no se le ha realizado una poda en años, es necesario hacerle una poda de renovación o rejuvenecimiento, con el fin de eliminar las ramas viejas y hacerle una limpieza para que crezcan nuevos brotes. Se trata de una poda drástica, para rejuvenecer el arándano, aunque también se puede hacer de forma progresiva. En el primer caso, lo que haremos es cortar a ras de suelo toda la planta. Esto sólo se debe hacer si el ejemplar tiene fuerza para soportarlo y asegurándole luego riego y abono (SMEAP, 2023).

La poda progresiva de rejuvenecimiento, consiste en eliminar el 50 % de las ramas, cortándolas a ras de su inserción. Las ramas que se conserven se cortan a la mitad de su longitud o bien sólo un tercio de la punta sobre el mejor brote que podamos encontrar en ella. Realizar reconocimientos y conteo de estructuras con sus yemas frutales formadas. Remover ramas viejas, mayor a tres años, improproductivas o

enfermas. Eliminar ramas o ramillas (8 cm o menos) de crecimiento que se dirigen al interior y brotes cercanos al suelo. Dejar ramillas de más de 20 cm, solo despuntar para dejar 12 a 14 yemas por ramillas (Quintana y Morales, 2021).

Los aspectos sanitarios son fundamentales a tratar en el cultivo de arándanos relacionado con la poda son: mantener los equipos limpios antes de la poda; al monitorear o manipular partes de la planta, tener las manos limpias o usar guantes quirúrgicos; lavar los contenedores antes y después de la recolección de los frutos, esterilizar con frecuencia las tijeras de poda (antes, durante y después) y lavar frutos recolectados con agua potable con el fin de limpiar el mismo (Romero, 2009).

1.2.9 Problemas fitosanitarios del arándano en México.

El arándano es una especie vigorosa, de rápido crecimiento y altos rendimientos, pero susceptible a varias enfermedades que pueden alterar su desarrollo, acortar su vida productiva y afectar la calidad y cantidad de fruta. La alta densidad de plantas en los huertos y el tipo de fertilización para sostener la producción al máximo, facilita el establecimiento y diseminación de enfermedades. Las enfermedades más importante son las que afectan ramas y frutos (Undurranga y Vargas, 2013).

1.2.9.1 Antracnosis (*Colletotrichum* sp.).

El hongo puede afectar a ramas, hojas y flores, ya que puede causar pudrición de la corona y raíz, enrollamiento foliar, defoliación, tizón de la flor y pudrición del fruto, el cual es uno de los daños más graves, ya que pueden ser asintomáticos en la planta y producir grandes pérdidas en postcosecha. La infección tiene lugar durante la floración, en frutos, donde las lesiones comienzan como manchas hundidas y húmedas (Figura 9) que al crecer pueden cubrir todo el fruto. Sobre las manchas se visualizan acérvulos de color café oscuro que liberan masas de conidios color rosa (EPPO, 2003). Los cultivares “rabbiteye” son, en general, menos susceptibles que los “highbush”.



Figura 9: Antracnosis del arándano; A) la fruta no desarrolla síntomas hasta que estén maduros (azul); B) masas de esporas de color naranja brillante se producen dentro de áreas arrugadas y hundidas en la superficie de la fruta y C) masas de esporas sobre ramilla con brote. Tomado y modificado de Wharton y Diéguez, 2004

1.2.9.2 *Botrytis* o moho gris (*Botrytis cinerea*).

La mayor incidencia de esta enfermedad coincide con primaveras muy lluviosas y temperaturas en torno a los 20°C. Los síntomas se manifiestan con el marchitamiento de los brotes jóvenes, que al principio toman un color marrón o negro, para pasar más tarde a tostado o gris, con lo que pueden alcanzar toda la rama, con afectaciones a flores y frutos, aunque también pueden afectar hojas, en éstas últimas causa lesiones de color café que por lo general comienzan en el centro de la lámina foliar y se extienden hacia los bordes, donde produce necrosis. Las flores marchitas permanecen en la planta mucho más tiempo que las no afectadas. En los frutos inmaduros también se puede observar necrosis, pero está condicionada a la presencia de restos florales (Figura 10). Las partes viejas de la planta rara vez son atacadas, aunque en ellas el hongo puede vivir como saprófito durante el invierno, propagándose en primavera en forma de esporas que afectan a los racimos florales e incluso a los frutos, los cuales presentan un aspecto momificado, además produce gran cantidad de micelio gris. Los síntomas de tizón en la madera se inician en un racimo floral afectado por el patógeno, los cuales avanzan hacia la madera y producen una lesión más o menos circular, de color café, y que puede terminar en un anillado necrótico, con lo que la rama se seca por sobre la lesión. Estos síntomas son más frecuentes en brotes nuevos, sobre todo si hay excesos de nitrógeno o crecimientos tardíos. En las ramas enfermas pueden formarse esclerocios, los que se observan insertos en la corteza como pequeñas estructuras negras de formas irregulares (Montiel-Frausto y Vásquez-López, 2021).



Figura 10: Síntomas inducidos por *Botrytis* en el cultivo de arándano: A) marchitez en jóvenes; B) necrosis en flores y frutos jóvenes; C) lesiones en frutos maduros.

1.2.9.3 *Monilia (Monilia sp.)*.

Es una de las enfermedades más comunes en el arándano, tanto en los grupos “highbush” como “rabbiteye”. Este hongo afecta brotes, hojas, flores y frutos, y llegan a reducir la cosecha. Las ramas y flores afectadas se marchitan y se tornan color marrón, como si estuvieran quemadas. Las hojas y brotes desarrollados en la primavera se caen. En los frutos no se aprecia el daño hasta casi la madurez, adquieren un color crema o rosa salmón, y con el tiempo se tornan rojizos o marrón claro. Las pérdidas de cosecha pueden ser graves, según el nivel del inóculo, de las condiciones ambientales y de la susceptibilidad del cultivar (Undurranga y Vargas, 2013).

1.2.9.4 *Phomopsis (Phomopsis vaccinii)*.

Causa muerte regresiva de ramillas terminales hasta a la base de la ramilla de la temporada anterior; se puede observar una coloración negra brillante; de igual manera, puede desarrollar canchales superficiales y lisos, sobre los cuales se pueden formar picnidios que se observan como pequeñas puntuaciones de color oscuro en las ramillas, que afectan las ramas productivas de la siguiente temporada. Esta enfermedad fue una de las primeras observadas en las plantaciones americanas, y ha adquirido importancia económica, ya que puede llegar a matar por completo a plantas jóvenes. El hongo penetra en las yemas florales y el tallo. Los síntomas comienzan a notarse en brotes jóvenes de primavera, secándose el extremo apical, que queda doblado en forma característica de bastón. La ocurrencia de la enfermedad se incrementa año con año y reduce la producción de frutos. Los daños severos en plantaciones adultas se observan durante el verano, cuando es común ver plantas con parte de las ramas principales secas por completo y el resto sanas. Las esporas

producidas se diseminan con la lluvia. Los frutos dañados son blandos, a menudo se agrietan y pierden jugo (France, 2017).

1.2.9.5 *Alternaria (Alternaria sp.)*.

Este hongo es uno de las principales causantes de la podredumbre de los frutos de arándano. El patógeno causa lesiones hundidas en los frutos cuando la infección se produce antes de la cosecha. La superficie del área infectada a menudo se cubre por una masa de esporas de color verde-negruzca, lo que permite diferenciarla de la antracnosis. Las infecciones ocurren a través de la cicatriz de los frutos (France, 2017).

1.2.9.6 *Phytophthora (Phytophthora sp.)*.

La pudrición de la raíz causada por este oomicete, puede provocar muerte súbita de la planta o manifestarse como una enfermedad lenta y progresiva caracterizada por un débil crecimiento y un prematuro color del follaje amarillo o rojizo en el otoño. Las plantas infectadas tienen con frecuencia una fijación pobre al suelo debido a un escaso desarrollo radical. Esta enfermedad se favorece por un mal drenaje del suelo que provoca encharcamientos o exceso de humedad (France, 2017).

1.2.9.7 Hongos de la madera.

Los huertos también son colonizados por hongos que comprometen la sanidad y estabilidad de la planta. En este grupo se cuentan los hongos de la madera asociadas a la especie *Chondrostereum purpureum*, enfermedad conocida como 'plateado', pero también a un complejo de hongos en el que intervienen especies como: *Neofusicoccum*, *Bostryosphaeria*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* entre otros. Estos hongos pueden encontrarse en una misma planta, tanto como especies individuales como asociados (Morales, 2017).

1.2.9.7.1. *Chondrostereum purpureum*.

Las hojas muestran una coloración plomiza que se intensifica en las hojas superiores, la epidermis de estas hojas se puede desprender con facilidad, expone un mesófilo sano que luego se quemará con el sol, lo que deja lesiones necróticas en las hojas. En los tallos se observa necrosis en el centro de la madera, la que se intensifica hacia la base. Los tallos son más frágiles y se pueden despatillar con facilidad. La fruta de ramas plateadas es más pequeña y no completa la madurez (Figura 11). El arbusto muere en 3 a 4 temporadas si no se realiza manejo de la enfermedad (Morales, 2017).



Figura 11: Síntomas en el cultivo de arándano por la infección de *Chondrostereum purpureum*. A) Hojas color plumizo; B) necrosis en centro de los tallos; C) daño en frutos

1.2.9.7.2. *Diaporthe vaccinii*.

Causa muerte regresiva de ramillas terminales hasta llegar a la base de la ramilla de la temporada anterior y una coloración negra brillante. Hay desarrollo de canchros superficiales y lisos, sobre los cuales se pueden formar picnidios en forma de pera, que en su interior contiene los conidios, que están inmersos en la corteza y se observan como pequeños puntos negros en la superficie de la rama enferma. La muerte de ramas afecta a la parte productiva de la próxima temporada (Morales, 2017).

1.2.9.7.3. *Pestalotia vaccinii*.

Solo infecta tallos nuevos, los que muestran clorosis del follaje y muerte completa de ramas, y en la base se produce un anillado de color café oscuro con o sin partiduras en la corteza. En la zona del cuello se producen numerosos acérvulos (estructuras reproductivas con forma de cojín), que levantan la corteza para liberar gran cantidad de conidios de color negro. En las hojas se forma una necrosis extensiva, de bordes definidos, similar a la que produce *Botrytis cinerea*, esta necrosis va acompañada de la formación de acérvulos similares a los que se producen en el tallo (Wharton y Schilder, 2003).

La familia Botryosphaeriaceae está integrada por 23 géneros de hongos cosmopolitas que pueden ser endófitos, fitopatógenos o saprófitos, que afectan una gran variedad de plantas leñosas (Slippers y Wingfield, 2007; Slippers *et al.*, 2017). Por lo general infecta planas en condiciones de estrés (De Wet *et al.*, 2003). Induce síntomas como canchros, gomosis, muerte descendente de ramas, defoliación, necrosis de hojas y

muerte de la planta, el conjunto de estos síntomas es conocido como síndrome de declinamiento (Slippers y Wingfield, 2007).

Botryosphaeriaceae, es una de las principales familias de la clase Dothideomycetes. Muchos de sus miembros son fitopatógenos oportunistas, que afectan un gran número de plantas de importancia económica a nivel mundial. Los géneros con distribución geográfica mundial que afectan a un mayor número de hospedantes son: *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*, que engloban un 70%, con un aproximado de 300 especies fitopatógenas (Slippers *et al.*, 2017). Estos hongos pueden infectar a las plantas a través de heridas o aberturas naturales, como lenticelas y estomas. Una vez que ingresan a los tejidos del huésped, pueden sobrevivir como endófitos para permanecer en una etapa biotrófica durante mucho tiempo y pasar a la etapa necrotrófica destructiva cuando el huésped está estresado por sequía, daño físico, encharcamiento o congelación. Así mismo, pueden infectar muchas plantas leñosas y causar síntomas graves como muerte regresiva, cancro de ramas, manchas foliares y pudrición de frutos y semillas. La característica excepcional Botryosphaeriaceae es que la fase sexual es muy difícil de observar tanto en condiciones naturales como experimentales, aunque no significa que la reproducción sexual no se presente (Phillips *et al.*, 2013).

La descripción de especies en nuevas regiones geográficas, es indicativo de que los miembros de esta familia están distribuidos por todo el mundo, como resultado de la globalización comercial, lo que amenaza los agroecosistemas (Netto *et al.*, 2017; Slippers *et al.*, 2017).

1.2.9.7.4. *Botryosphaeria corticis*.

La enfermedad inicia con la clorosis de las hojas y leve enrojecimiento del borde de la lámina foliar, seguido de una rápida marchitez del follaje, similar al causado por la falta de agua. Luego las hojas se tornan café claro y permanecen adheridas por un tiempo. La muerte de ramas es repentina y se produce desde mediados del verano. En la base de las ramas enfermas se pueden presentar partiduras de la corteza y desarrollo de canchales irregulares. Bajo o sobre la corteza se observan picnidios de color negro que por lo común están agrupados. Al cortar las ramas enfermas se observa una necrosis parcial con forma de abanico o semicírculo, la que crece hasta necrosar toda la rama,

momento en el cual se produce la muerte. Sin control, la planta se debilita en forma progresiva por disminución de ramas y follaje. Las especies descritas se han separado por morfología y filogenia, y se han relacionado con síntomas de muerte regresiva, gomosis y cancro en una amplia diversidad de especies (Punithalingam 1980; Sutton, 1980).

1.2.9.7.5. *Lasiodiplodia* sp.

Las especies de *Lasiodiplodia*, son comunes, en especial en regiones tropicales y subtropicales donde causan una variedad de enfermedades (Figura 12). Su descripción se basa en *Lasiodiplodia theobromae*. Las principales características que distinguen a este género son la presencia de paráfisis picnidiales y estrías longitudinales en los conidios maduros. Hasta el momento se han descrito 20 especies y se diferencian con base en la morfología de los conidios y paráfisis. Presentan micelio sumergido o superficial, ramificado, septado, de color marrón oscuro. Picnidio estromático, sumergido o superficial, separado o agregado, globoso, de color marrón oscuro, uni o multilocular, a menudo cubierto por micelio aéreo. Pared de color marrón oscuro, conidióforos ausentes. Células conidiógenas holoblásticas, determinadas, discretas, cilíndricas, hialinas, lisas y de paredes delgadas, formadas por células que recubren las paredes picnidiales internas de 8–18 × 3–4.5 µm. Paráfisis hialinas, cilíndricas, aseptadas, no ramificadas, extremos redondeados de hasta 41 µm de largo y 2–3 µm de ancho. Conidios acrogéneos, ovoides a subglobosos, hialinos cuando son jóvenes, que luego se tornan uniseptados, de color marrón oscuro, de paredes gruesas, con frecuencia con ápices redondeados, a veces con la base truncada, 16–23 × 11–17 µm y estrías longitudinales (Machado *et al.*, 2014).

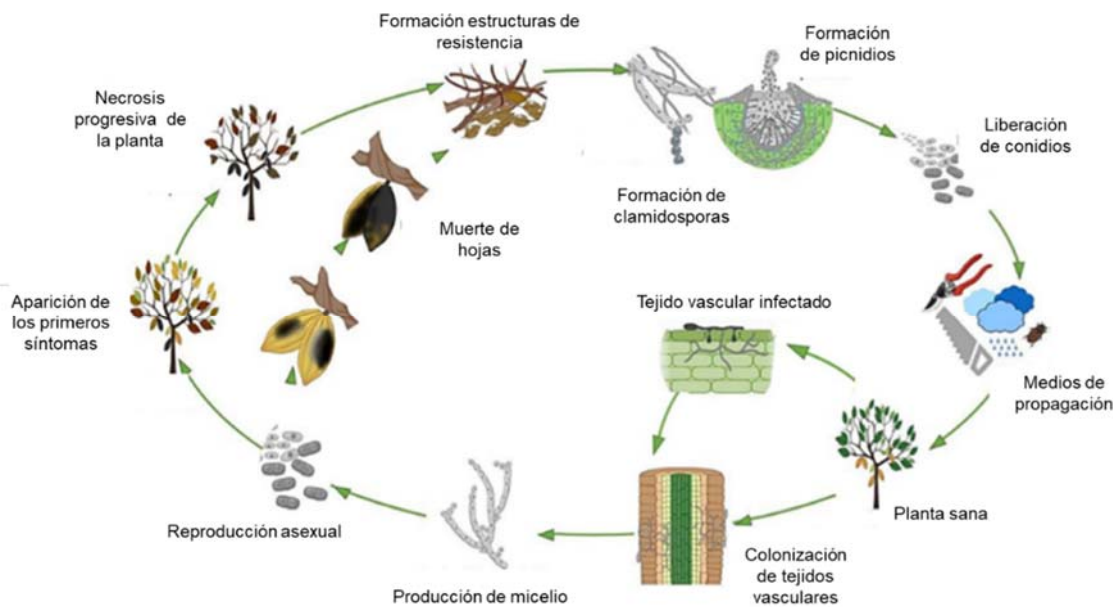


Figura 12: Ciclo de vida de *Lasiodiplodia sp.* Tomado y adaptado de: Bragard et al., 2023; <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2023.7737>

1.2.10 Genómica

En la actualidad, la tecnología genómica se ha utilizado de forma amplia para estudiar muchos hongos fitopatógenos y ha promovido en gran medida la comprensión de su evolución y mecanismos patogénicos. Por ejemplo, la expansión de la familia de genes asociada con factores de virulencia en hongos patógenos colonizadores de la madera en Botryosphaeriaceae se reveló a través de comparaciones filogenómicas (García et al., 2021)

Con el creciente uso de técnicas de ADN recombinante en la investigación, la preparación de ADN largo y puro se ha convertido en una preocupación importante. Dado que las mismas fuerzas que se requieren para romper las paredes celulares también pueden cortar el ADN, se debe tener mucho cuidado y a menudo se debe llegar a un compromiso entre los rendimientos de ADN y la longitud, de tal manera que los núcleos intactos son una buena fuente de partida para el ADN largo, así mismo, estos pueden ser difíciles de aislar en cantidad y las técnicas requeridas a menudo son bastante complicadas. Las plantas, hongos y bacterias, pueden tener niveles variables de metabolitos y biomoléculas estructurales. Los polisacáridos, polifenoles y taninos suponen un gran problema porque son difíciles de separar del ADN (Cuadro1).

Los contaminantes similares a los polisacáridos, que son indetectables según la mayoría de los criterios, pueden causar una cinética de reasociación anómala, por lo que una gran cantidad de problemas iniciales encontrados en la clonación se han atribuido a contaminantes que interfieren con las nucleasas de restricción, así como a ADN de longitud insuficiente. Con el siguiente procedimiento de restricción, el análisis del ADN puede realizarse al día siguiente del inicio del aislamiento del ADN. El análisis electroforético después de la restricción muestra bandas muy nítidas incluso para fragmentos de alto peso molecular (Yu *et al.*, 2022).

Cuadro 1: Valores indicativos de pureza en muestra de ADN, tomado de: Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN <http://programa-control-calidad-muestras.pdf> (bancoadn.org)

Técnica de análisis	Análisis	Parámetros	Criterios de validez
	A 260/280	Pureza	≥1.8-2.1 Pureza Optima ≥1.6-1.7 Pureza aceptable <1.6 ADN Contaminado con compuestos aromáticos >2.1 ADN Contaminado con ARN
Espectrofotometría	A 260/230	Pureza	>2-2.2 Pureza Optima* >1.8 Pureza aceptable* <1.8 ADN Contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono <1.5 ADN Altamente contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono

*Estos ratios sólo tendrían validez con concentraciones altas de ADN (aprox. >50ng/μl)

Existen métodos que eliminan con eficacia los polisacáridos y polifenoles de las preparaciones de ADN vegetal. El uso de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), un detergente catiónico, facilita la separación de los polisacáridos durante la purificación, mientras que los aditivos, como la polivinilpirrolidona, pueden ayudar a eliminar los polifenoles. Los tampones de extracción basados en CTAB se utilizan para purificar el ADN de los tejidos vegetales (Murray y Thompson, 1980).

Las secuencias de los genes que codifican para el factor de elongación 1- α (TEF1- α), beta tubulina (β -Tub) y los espaciadores internos transcritos (ITS), son las regiones

moleculares más utilizadas en los análisis filogenéticos para la identificación de especies de Botryosphaeriaceae (White *et al.*, 1990; Alves *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2015).

1.2.11 Secuenciación

Los procedimientos de secuenciación automatizada se basan en el método enzimático de la Técnica de Sanger y Tecnología capilar, que suple el marcaje radiactivo con métodos quimioluminiscentes que usan fluorocromos. Con este protocolo el fragmento de ADN fluorescente pasa por el punto de tensión del secuenciador automático, y estas señales se envían a una computadora con un programa especial. Así, un golpe de láser excita la tinción fluorescente, la señal de fluorescencia emitida se digitaliza y se capta por detectores que una computadora se analiza, descifra y observan los resultados obtenidos en tiempo real. Para cada muestra secuenciada se crean curvas de cuatro colores, uno por cada nucleótido, y debajo de cada pico de la secuencia se identifican los nucleótidos correspondientes al fragmento analizado (Gómez *et al.*, 2013).

Cuando el fluoróforo se agrega en la terminación de la cadena, los ddNTP se marcan con fluorocromos de diferente color para cada base, con lo cual la terminación de cada cadena determina el color y, por ende, el NTP respectivo. Esto hace que al fluorescer a diferentes longitudes de onda, el sistema óptico del equipo identifique de forma directa en un gráfico las señales de fluorescencia de cada una de las bases. El gráfico que se genera (Electroferograma) es acorde con el color del fluorocromo, en el cual se representa cada base con picos de diferente intensidad de luz (Gómez *et al.*, 2013).

1.2.13 Dendograma o árbol filogenético

La representación gráfica de una clasificación jerárquica es un dendograma o árbol filogenético que indicará como se asocian los individuos objeto del análisis, a medida que disminuye el grado de semejanza entre ellos. Estos árboles por lo general, van acompañados por un eje que indica la distancia y/o similaridad a la que se han producido las diferentes uniones y que se denomina índice de jerarquía. Para dividir o clasificar los individuos en grupos distintos basta con trazar una línea recta para un valor de índice determinado y observar los “clusters” constituidos por debajo de dicho

valor, y se ignoran los agrupamientos que se producen con un valor superior al 90% (Bramardi, 2007).

1.3 Planteamiento del problema

En 1996, el arándano (*V. corymbosum* L.) fue introducido a México, momento a partir del cual experimentó un crecimiento casi exponencial. La mayoría de los estados en los que se cultiva, están ubicados en las costas del pacífico: Jalisco, Michoacán, Sinaloa, Baja California y Colima, en tanto que más al centro del país se han sumado Guanajuato y Puebla. Así mismo, por las características particulares de los sistemas de producción y las densidades de plantación, este cultivo es susceptible a enfermedades fúngicas, lo que limita la calidad y producción. La muerte descendente de las plantas de arándano, se presenta cuando éstas se han establecido en el campo y posterior a las podas, por lo que es conveniente realizar una correcta identificación y un buen diagnóstico para establecer programas de manejo de la enfermedad, ya que en la actualidad no se dispone de tratamientos convencionales efectivos para su manejo.

1.4 Justificación

El arándano (*V. corymbosum* L.) es un frutal de reciente domesticación que ha incrementado su superficie sembrada a nivel mundial, donde México aporta un volumen de 67,304.53 t, del cual Sinaloa produce 26,634 t. Por otro lado, la demanda de los consumidores por productos de mayor calidad e inocuidad, nos obligan a buscar alternativas que faciliten a los productores a alcanzar dichos estándares de producción. El cultivo de arándano es susceptible a enfermedades fúngicas, donde destacan los “hongos de la madera” como causantes de la “muerte descendente”. En el diagnóstico fitopatológico en plantas de arándano con síntomas típicos de muerte descendente, se han observado diferencias morfológicas en los aislados obtenidos, lo cual sugiere la presencia de más de una especie presente y causante de esta enfermedad en arándano. Por lo anterior, el objetivo de este estudio es identificar las especies de hongos asociadas con la muerte descendente del arándano en el norte de Sinaloa, así como evaluar estrategias de poda y sellado para los programas de manejo de este cultivo.

1.5 HIPÓTESIS

La muerte descendente del arándano es causada por un complejo de hongos de la madera y se infiere que su propagación puede estar relacionada con técnicas inadecuadas de poda.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo general

Identificar las especies del complejo de hongos asociados a la muerte descendente del arándano en el norte de Sinaloa y evaluar estrategias de poda para su manejo.

Objetivos específicos

1. Caracterizar de forma patogénica, morfométrica y molecular a los hongos asociados con la muerte descendente del arándano.
2. Evaluar *in planta* dos técnicas de poda y sellado (pintura vinílica, pintura vinílica + Cu y agua oxigenada), utilizadas en la región, en correlación a la incidencia de hongos de la madera en arándano.
3. Evaluar *in planta* patogenicidad inducida mediante aislados identificados de forma molecular.

CAPÍTULO 2: Hongos fitopatógenos asociados a la muerte descendente del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), su manejo con poda y sellado en el norte de Sinaloa, México.

RESUMEN

El arándano es un frutal de reciente domesticación en el mundo, el cual, en años recientes ha ganado auge como cultivo en el estado de Sinaloa, sin embargo, en años recientes se ha observado una alta incidencia de la enfermedad llamada muerte descendente, la cual afecta la producción por la rapidez con que se propaga a partir de las podas. El objetivo del presente trabajo fue identificar a los hongos fitopatógenos relacionados con la muerte descendente del arándano, verificar su patogenicidad, su incidencia posterior a la poda y el tipo de sellado. Para esto se recolectaron muestras de tallos y ramas sintomáticas en ocho lotes comerciales de arándano en los municipios de Ahome, El Fuerte y Guasave en el estado de Sinaloa, de los cuales se obtuvieron 173 aislados fúngicos, que se identificaron por morfología; para luego realizar pruebas de patogenicidad en hoja desprendida y en varetas de arándano variedad Biloxi; así mismo, se evaluaron dos ángulos de poda y tres selladores en comparación con un testigo absoluto con un arreglo completamente al azar. Con base en análisis morfológicos se determinaron los géneros: *Alternaria*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotia* y *Curvularia*, no obstante, solo los aislados de *Lasiodiplodia* fueron patogénicos en hojas y varetas, en tanto que el mejor resultado se alcanza con el ángulo de poda de 45° y 180° el sellado con pintura vinílica tipo plástico lavable más oxiclورو de cobre. Los resultados alcanzados abren nuevas líneas de investigación relacionadas con la identificación molecular e impacto de la enfermedad en el rendimiento.

Palabras clave: arándano, muerte descendente, *Lasiodiplodia*.

ABSTRACT

The blueberry is a fruit tree of recent domestication in the world, which, in recent years has gained momentum as a crop in the state of Sinaloa, however, in recent years there has been a high incidence of the disease called descending death, which affects production by the speed with which it spreads from pruning. The objective of this work was to identify the phytopathogenic fungi related to the downward death of blueberry, verify their pathogenicity, their incidence after pruning and the type of sealing. For this, samples of symptomatic stems and branches were collected in eight commercial blueberry lots in the municipalities of Ahome, El Fuerte and Ahome in the state of Sinaloa, of which 173 fungal isolates were obtained, which were morphologically identified; to subsequently perform pathogenicity tests on detached leaf and bilox rods; Likewise, 2 pruning angles and three sealants were evaluated compared to an absolute control with a completely random arrangement. Based on morphological analysis, the genera were determined: *Alternaria*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotia* and *Curvularia*, however, only the isolates of *Lasiodiplodia* were pathogenic in leaves and rods, while the best result is achieved with the angle of pruning 45° and sealing with vinyl paint type washable plastic plus copper oxychloride. The results achieved open new lines of research related to the molecular identification and impact of the disease on performance.

Keywords: blueberry, dieback, *Lasiodiplodia*.

2.1 INTRODUCCIÓN

En el medio ambiente, todos los microorganismos conviven en poblaciones mixtas, lo que dificulta su estudio si queremos caracterizarlos e identificarlos. Para ello, es necesario su aislamiento y purificación. Un microorganismo puro, es aquel que proviene de una sola célula, y para garantizar la pureza del cultivo obtenido, es necesario depositarlo con asepsia en un medio de cultivo. El aislamiento de microorganismos es un conjunto de técnicas empleadas para extraer y separar a las especies de interés desde su hábitat natural hasta un hábitat *in vitro*. Estas técnicas son un conjunto de muchas herramientas básicas y necesarias para los estudios microbiológicos y caracterización, ya que, dependiendo del medio de cultivo empleado, estos crecen y se desarrollan de manera diferente (Ormeño-Villajos, 2024).

Una parte fundamental del aislamiento es la toma de muestras ya que es el primer requisito para un buen diagnóstico fitosanitario, de tal manera que, el material obtenido sea representativo y confiable, así como la elección de las zonas de muestreo, pues de esto dependerá el éxito de la obtención del patógeno buscado y/o la correcta identificación de los agentes causales de alguna enfermedad. Por otro lado, la preservación de las colecciones de microorganismos juega un papel importante en el ámbito de la investigación, por lo que se requieren métodos confiables de preservación y de cultivos de organismos puros; que puedan garantizar la viabilidad y conservación de un alto porcentaje de células, así como reducir al máximo los riesgos por contaminación, hasta el momento de su utilización (Nakasone *et al.*, 2004).

La conservación de dichos organismos requieren de métodos específicos, que atiendan el factor tiempo y características fisiológicas de cada especie; lo que hace que estos se agrupen como métodos a corto y largo plazo, así como algunos métodos alternativos (Cañedo y Ames, 2004).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Área de estudio y recolecta de material

La recolección de tejido vegetal (tallos y ramas) enfermo fue durante recorridos de campo en seis huertos comerciales de arándano variedad Biloxi en los municipios de Ahome, El Fuerte y Guasave, Sinaloa (Figura 13). Los huertos muestreados fueron georreferenciados mediante GPS Apple iOS y My GPS Coordinates iOS (Cuadro 2).

Durante los meses de octubre y noviembre de 2020, así como marzo, abril, junio y diciembre de 2021, con la ayuda de tijeras de poda, se recolectaron tallos y ramas con síntomas de muerte descendente, las cuales se guardaron en bolsas plásticas con cierre hermético (Ziploc®), se etiquetaron y se colocaron dentro de una hielera con una temperatura aproximada de 15°C, para trasladarse al laboratorio de Botánica de la Universidad Autónoma de Occidente Unidad Regional Los Mochis (UAdeO, UR Los Mochis) y ser procesadas en las siguientes 12 horas.

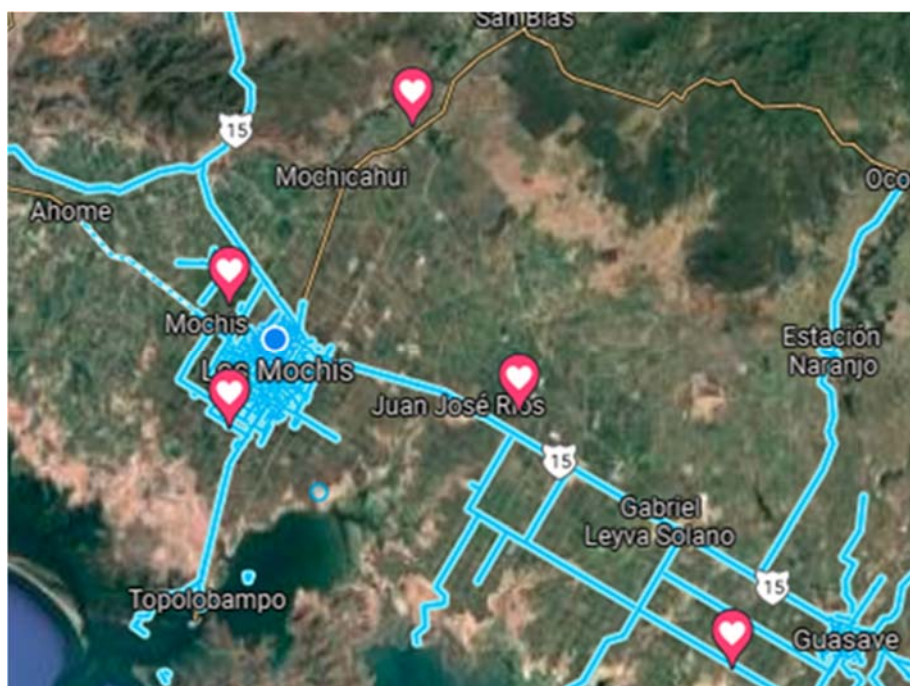


Figura 13: Mapa de zona de muestreo.

Cuadro 2: Localidades y georreferencia de los sitios de recolección en los municipios de El Fuerte, Ahome y Guasave.

Localidad	Fecha	Latitud Norte	Longitud Oeste
Ejido San Antonio, Guasave	10/10/2020	25°32'45.8"N	108°34'20.6"W
Ejido Bachoco, Guasave	18/11/2020	25°45'19.2"N	108°45'59.8"W
Ejido San Antonio, Guasave	21/03/2021	25°32'45.8"N	108°34'20.6"W
Ejido Compuertas, Ahome	10/04/2021	25°50'40.9"N	109°01'45.9"W
Ejido Camajoa, El Fuerte	14/06/2021	25°59'30.5"N	108°51'49.9"W
Ejido 9 de Diciembre, Ahome	24/06/2021	25°44'39.5"N	109°01'49.2"W
Ejido Compuertas, Ahome	12/07/2021	25°50'40.9"N	109°01'45.9"W

2.2.3 Obtención de aislados y purificación

Los aislados se obtuvieron a partir de cortes de 2-3 mm, a partir de la zona de avance del síntoma, en seguida se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 0.5% durante 2 minutos y de inmediato se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Enseguida, los cortes de tejido se colocaron en papel absorbente estéril, para su secado y cuatro de ellos se sembraron placas Petri con medio de cultivo Agua-Agar (AA), éstos se incubaron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por ± 72 horas, hasta observar crecimiento micelial. Por último, puntas de hifa se transfirieron a placas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (BIOXON BX-211900; México), para la purificación de los aislados y la inducción de esporulación (Rodrigues *et al.*, 2010).

2.2.4 Preservación de aislados.

2.2.4.1 Método de conservación a corto plazo

2.2.4.1.1 Agua Destilada Tres veces Estéril (ADTE)

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos. En tubos de cultivo de 10mL, se colocaron 5 mL de agua destilada, y se esterilizaron tres veces cada 24 horas entre esterilización. A las 24 horas después de la última esterilización, se transfirieron discos de PDA de 5 mm de diametro con micelio activo de siete días de edad dentro de los tubos, los cuales se sellaron de forma hermética y se conservaron en refrigeración a 4°C (Nakasone *et al.*, 2004).

2.2.4.2 Método de conservación a largo plazo

2.2.4.2.1 Glicerol

En tubos de 2mL se colocaron 0.7 mL de glicerol al 10%, estos fueron esterilizados por tres ocasiones previo a su uso. Discos de PDA de 5 mm de diámetro con micelio activo de colonias de siete días de edad, se transfirieron a los tubos de 2mL que contenían el glicerol al 10 % y se almacenaron a temperaturas de -10°C y -20°C para su preservación (Arencibia-Arrebola *et al.*, 2008).

2.2.4.3 Método alternativo de conservación

2.2.4.3.1 Papel filtro

Cuadros de papel filtro estéril de 1cm^2 se colocaron en cajas Petri con medio PDA, y en el centro de éstas se depositó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con micelio activo de colonias de siete días de edad, dejándose incubar a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 días; una vez que los cuadros de papel fueron colonizados por el hongo, estos fueron

transferidos a cajas Petri nuevas para su desecación. Una vez secos, se guardaron en sobres de papel pergamino estéril y estos a su vez en sobres de papel estéril; se colocaron en bolsas resellables (Ziploc) y se almacenaron en refrigeración a 4°C (Arencibia-Arrebola *et al.*, 2008).

2.2.5 Descripción fenotípica de las colonias

Los cultivos puros se transfirieron a cajas Petri con PDA, Agar- Extracto de Malta (MEA), Avena-Agar (OMA) y Agar-V8 (AV8); y se registraron las características fenotípicas más importantes como tasa de crecimiento radial de la colonia (mm/día), color de la colonia, producción de pigmentos, tipo de margen, características de micelio y morfometría de conidios (Morales-Mora *et al.*, 2020).

2.2.5.1 Experimento comparativo de crecimiento radial

Disco de PDA con micelio activo de siete días de edad de los aislados puros fueron transferidos a cajas Petri con PDA, MEA, OMA y AV8. Las cajas Petri se sellaron con cinta termoelástica moldeable resistente a la humedad (ParaFilm M), y se incubaron por 12 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. La medición de la tasa de crecimiento micelial se realizó bajo el procedimiento propuesto por French y Hebert (1980) con una modificación, esta consistió en medir el diámetro del crecimiento micelial, desde el centro de la placa siempre en el mismo sentido y lugar, a partir de las 24 horas pos-siembra y luego se midió cada tercer día; hasta que la placa control esté colonizada por completo (Figura 14). Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento, cada placa constituyó una unidad experimental (French y Hebert, 1980).

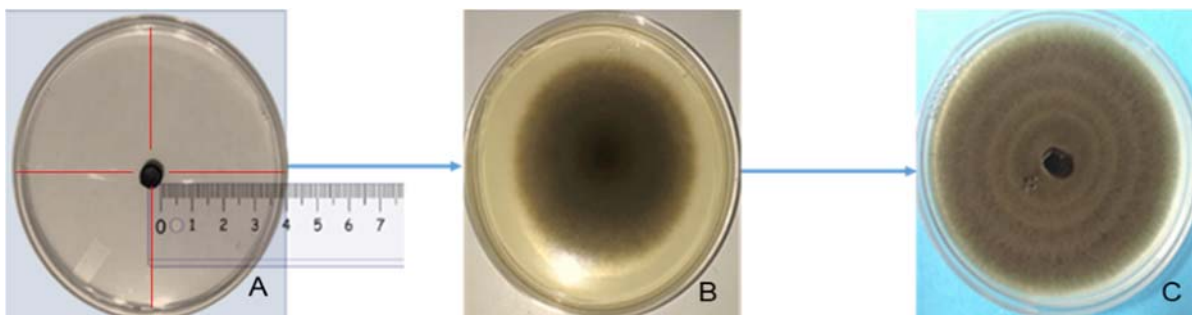


Figura 14: Tasa de crecimiento radial; A) inicio de mediciones; B) avance de crecimiento y C) Placa colonizada por completo.

2.2.5.2 Morfometría de los conidios de los aislados

Para los estudios morfométricos de conidios, los aislados se transfirieron a PDA, MEA, OMA y AV8; estos se incubaron por 15 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con un régimen de 12 horas de luz por 12 de oscuridad y cuando fue necesario, las condiciones se mantuvieron hasta formar estructuras como picnidios, con el fin de obtener estructuras reproductivas. De cada aislado se tomaron 40 conidios para determinar su longitud, ancho, relación longitud-ancho, así como el número de septos para cada aislado, estas mediciones se realizaron con un micrómetro instalado en el microscopio compuesto (Motic BA310E).

2.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de estadística descriptiva, para determinar la frecuencia con que se presentan los diferentes patógenos relacionados con la muerte descendente del arándano. Las dimensiones de conidio en los medios de cultivo evaluados, el tamaño en longitud de las lesiones en las pruebas en vareta y planta y el crecimiento micelial (mm) se compararon mediante las pruebas de ANOVA y HSD de Tukeys (diferencias honestamente significativas), para determinar la diferencia de medias ($p < 0.05$). Para el análisis de los datos se utilizó el programa IBM SPSS 26 Statistics.

2.2.7. Patología general

La evaluación de la patología general de los hongos encontrados se realizó mediante pruebas en hoja desprendida, con el fin de descartar a los hongos que no sean patogénicos al arándano.

2.2.7.1 Obtención de inóculo

Para la producción de inóculo y las pruebas de patogenicidad se implementó la metodología propuesta por Foolad *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Todos los aislados obtenidos de los muestreos de campo se sembraron en placas de Petri de 9 cm con medio PDA y se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad durante 7 días.

2.2.7.2 Obtención de hojas desprendidas de arándano.

La patogenicidad de los aislados se determinó en hojas desprendidas de arándano variedad Biloxi, las cuales se encontraban en la parte media de la planta y habían

alcanzado su máxima dimensión y madurez. Las hojas se obtuvieron de un huerto comercial del municipio de Ahome, Sinaloa, con poda reciente.

2.2.7.3 Pruebas de patogenicidad en hojas desprendidas de arándano

Las pruebas de patogenicidad en hojas desprendidas de arándano se realizaron con la metodología propuesta por Peever *et al.* (2000), con algunas modificaciones. Discos de PDA de 5 mm de diámetro con micelio activo del hongo, obtenidos del margen del crecimiento de las colonias, se transfirieron al envés de las hojas de arándano a las que se les realizó una punción con un palillo de madera, mismas que se desinfectaron con anticipación en una solución de hipoclorito de sodio al 1.25 %. Tres hojas inoculadas por aislado, se depositaron sobre una charola de poliestireno expandido, a las que se les colocó en el peciolo un algodón humedecido con agua corriente estéril y se introdujeron en bolsas plásticas resellables (Ziploc) para formar una cámara húmeda; este procedimiento se repitió para el tratamiento control en el que se emplearon discos de PDA sin hongo y se incubaron durante 7 días a 25 ± 2 °C. El experimento se realizó en el Laboratorio de Botánica de la UAdeO, UR Los Mochis, el experimento se condujo en dos ocasiones con un arreglo completamente al azar.

2.2.7.4 Pruebas de patogenicidad en vareta de arándano

La evaluación *in vitro* se realizó en ramas de 15 cm de longitud provenientes de plantas de arándano de 8 meses de edad. Para cada tratamiento, un disco de PDA de 5mm de diámetro con crecimiento fúngico se colocó sobre cada rama de arándano, y fueron depositadas en charolas de poliestireno expandido a razón de tres por charola para cada aislado. Las ramas se desinfectaron con anticipación y se realizó una herida, luego en sus extremos se colocó un algodón húmedo con agua corriente estéril, para evitar su deshidratación. Como tratamiento control, también se utilizaron tres ramas de arándano inoculadas con discos de PDA sin colonizar. Las charolas con las ramas fueron colocadas en dentro de bolsas plásticas resellables (ziploc) para generar una cámara húmeda. El experimento se realizó en dos ocasiones por un periodo de nueve días. La variable de respuesta fue la longitud de la lesión. Y el análisis estadístico realizado fueron pruebas de normalidad y comparación de medias por diferencia mínima significativa (DMS) (De la Mora-Castañeda *et al.*, 2007).

2.2.7.5 Pruebas de patogenicidad por poda en planta de arándano

Para la evaluación *in planta*, se realizaron podas en dos ángulos diferentes, 45° y 180°, y se evaluaron los siguientes selladores: pintura blanca vinílica tipo plástico lavable; pintura blanca vinílica + hidróxido de cobre; agua oxigenada y poda sin sellar y un testigo absoluto al cual no se realizó poda (Figura 15). Enseguida, las plantas se colocaron dentro de bolsas de polietileno transparentes de 0.90 x 1.5 m, con papel absorbente saturado con agua corriente para generar alta humedad relativa en el interior (Li *et al.*, 2014) durante 24 h con una variación de temperatura de 22 a 28°C en invernadero. Después, a las plantas se les removieron las bolsas y se mantuvieron en condiciones ambientales en el área de malla en la UAdeO UR Los Mochis; cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones y el ensayo duró 45 días, con un arreglo completamente al azar.


Angulo de poda	Sin sellador	Pintura vinílica	Pintura vinílica + Cobre	Agua oxigenada	Testigo
45°					
180°					

Figura 15: Tratamientos evaluados, ángulos de poda, testigo y total de individuos por tratamiento.

2.3 Resultados

De los muestreos realizados en los huertos comerciales del norte del estado (Figura 1 y Cuadro 1), se obtuvieron 173 aislados puros de punta de hifa, los cuales se preservaron.

Las características fenotípicas de las colonias y conidios de los aislados obtenidos durante el periodo de muestreo se determinaron en PDA después del periodo de incubación correspondiente, esto permitió la ubicación de 173 aislados distribuidos en cinco diferentes géneros : *Alternaria* spp. 79 aislados (45.7%), género aislado con mayor frecuencia en los sitios de muestreo, seguido de *Fusarium* spp. con 34 (19.7%), *Pestalotia* spp. 24 aislados (13.9%), *Lasiodiplodia* spp. 22 aislados (12.7%) y *Curvularia* spp. con 14 (8%) (Barnett y Hunter, 1972; Phillips *et al.*, 2013). La

distribución los patógenos, tuvo variaciones en los diferentes sitios de muestreo. No se encontraron los teleomorfos correspondientes durante el período de muestreo.

Alternaria spp. En PDA se observaron colonias con crecimiento micelial de 4.0 a 5.0 mm/día, de apariencia aterciopelada gris claro a gris oscuro, con bordes regulares y seis anillos concéntricos bien diferenciados, alternando gris claro a gris oscuro, reverso color gris oscuro, conidios clavados de color café de 25-45 μm de largo por 7-8 μm de ancho. Con 4 septos transversales y 2 longitudinales (Figura 16), con apéndice bien definido, lo que corresponde con lo descrito por Fabrega *et al.* (2012).

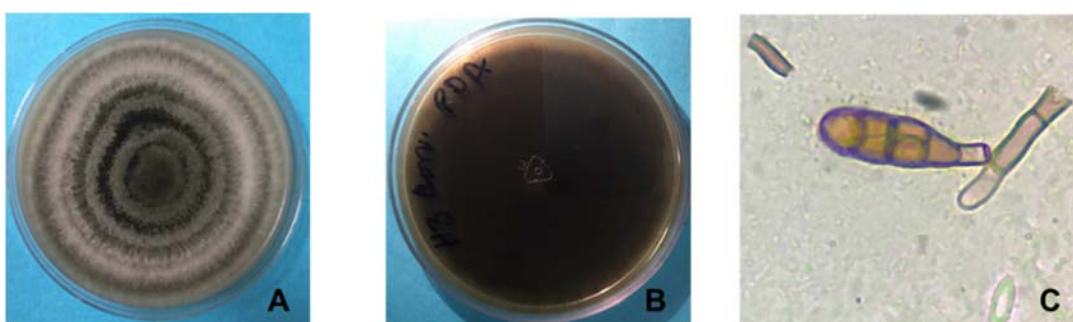


Figura 16: Aislado de *Alternaria* sp. en medio PDA, A) anverso de la colonia donde se aprecian anillos concéntricos; B) reverso y C) conidio.

Fusarium spp. En PDA colonias de apariencia algodonosa de color blanquecino con bordes irregulares que con el tiempo se tornan rosa muy tenue y crecimiento micelial de 4.0 a 5.5 mm/día, reverso en color rosa fuerte hay formación de esporodoquios, macroconidios curvados hialinos con 3 a 4 septos 17.12-57.62 μm de largo, microconidios oblongos unicelulares filides en forma de botella (Figura 17), similar a lo descrito por Tapia y Amaro (2014).

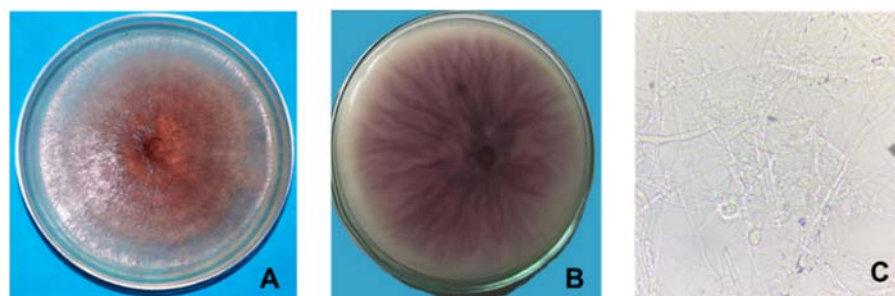


Figura 17: Aislado de *Fusarium* sp. en medio PDA; A) anverso de la colonia con tonalidades rosáceas; B) reverso y C) conidios.

Pestalotia spp. En PDA, colonias blancas de crecimiento moderado de 5 mm/día hifas hialinas, irregulares y septadas, de apariencia aterciopelada, bordes irregulares, con zonas marcadas por diferentes densidades de micelio (forma de roseta). Cuando madura forma acérvulos de color obscuro. Conidios son fusiformes de 25 a 30 μm de largo y de 7 a 10 μm de ancho, rectos o ligeramente curvos con cinco septos, los tres centrales en tonos marrón, las células basal y apical hialinas. En el extremo apical presentan de 2 a 3 apéndices filamentosos (Figura 18). El anverso en medio presenta coloraciones con tonalidades marrón anaranjado claro acorde con lo descrito por Barnett and Hunter (1972) y Phillips *et al.* (2013).

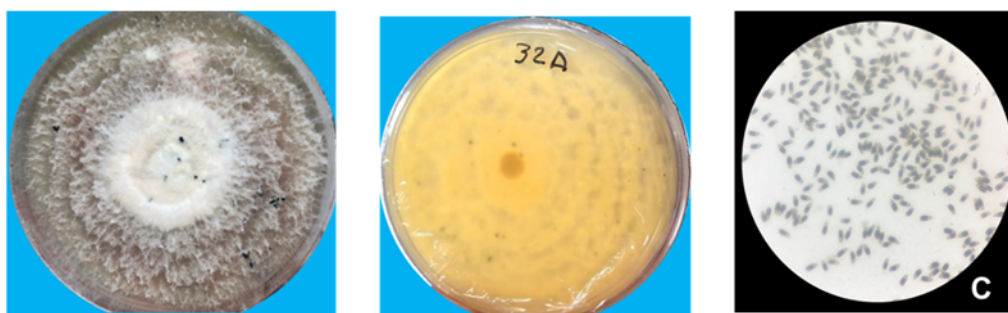


Figura 18: Aislado de *Pestalotia* sp. en medio PDA, A) anverso de la colonia con acérvulos; B) reverso y C) conidios.

Curvularia spp. En PDA colonias con crecimiento micelial de 3.5 – 4.0 mm/día, de aspecto aterciopelado, gris oliváceo, con anillos concéntricos tenues y penachos de conidios de color blanquecino; reverso de las colonias con pigmentación café-olivo. Conidióforos café oscuro rectos, septados, geniculados en la parte termina; conidios curvados de 15.0 – 20.5 μm de largo por 7.5 – 14.0 μm de ancho, con 3 a 4 septos transversales, con el septo medio (Figura 19). Más ancho y pigmentado e hilio oscuro. Estas características corresponden con lo descrito por Berbee *et al.* (1999).

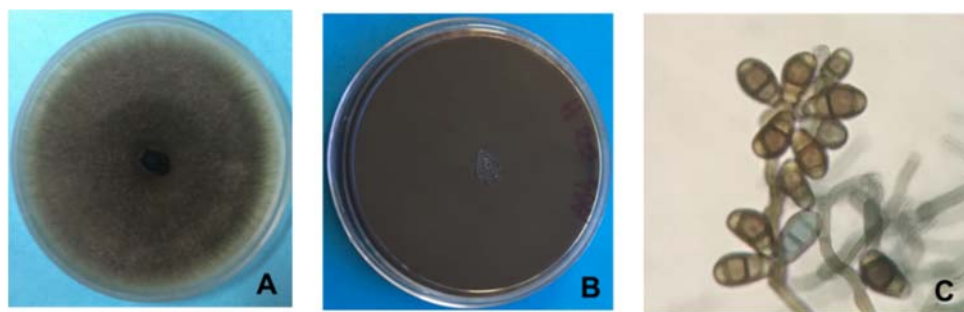


Figura 19: Aislado de *Curvularia* sp. en medio PDA, A) anverso de la colonia; B) reverso y C) conidios en conidióforo.

Lasiodiplodia sp. en medio PDA, anverso de aspecto blanco algodonoso al inicio, luego gris oliváceo y cuando maduraron se tornaron de color negro con rápido crecimiento micelial (en promedio 15.14mm/día). Formación de picnidios de color negro inmersos en el medio de cultivo. Hifas septadas ramificadas de color marrón oscuro. Paráfisis hialinas, cilíndricas, aseptadas, no ramificadas, extremos redondeados, Conidios elipsoides, hialinos unicelulares granulados al interior en estado inmaduro, maduras fueron bicelulares de 20-27.5 × 12.5–15 µm, de color marrón oscuro, con estriaciones longitudinales. Reverso, medio de cultivo de gris oscuro a negro, con bandas radiales en color gris claro (Figura20), lo que coincide con lo descrito por Barnett and Hunter (1972) y Phillips *et al.* (2013).

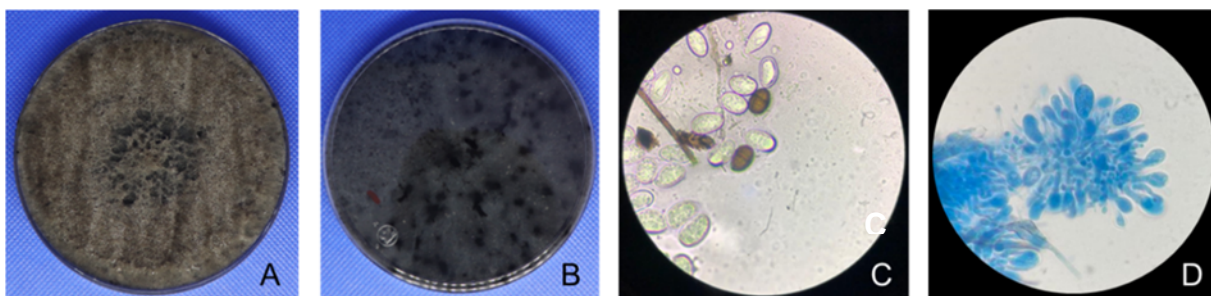


Figura 20: Aislado de *Lasiodiplodia* sp. en medio PDA; A) anverso de la colonia, B) reverso, C) conidios maduros e inmaduros y D) paráfisis.

Lasiodiplodia sp. en medio MEA, anverso con superficie algodonosa al inicio blanco traslucido y luego se torna gris hasta llegar a gris muy oscuro, micelio septado, de color marrón oscuro, con un promedio de crecimiento radial por día de 15.01 mm. Picnidio globoso de color marrón oscuro a negro, sumergido en el medio de cultivo. Conidióforos ausentes, células conidiógenas pequeñas hialinas, lisas y de paredes delgadas. Paráfisis hialinas, cilíndricas, aseptadas, no ramificadas, extremos redondeados, conidios ovoides a subglobosos, hialinos con gránulos al interior cuando jóvenes, uniseptados, al madurar bicelulares, de color marrón oscuro, de paredes gruesas, con frecuencia con ápices redondeados, de 22.5-27. × 12.5–15 µm y estriás longitudinales. Reverso color gris oscuro a negro (Figura 21).

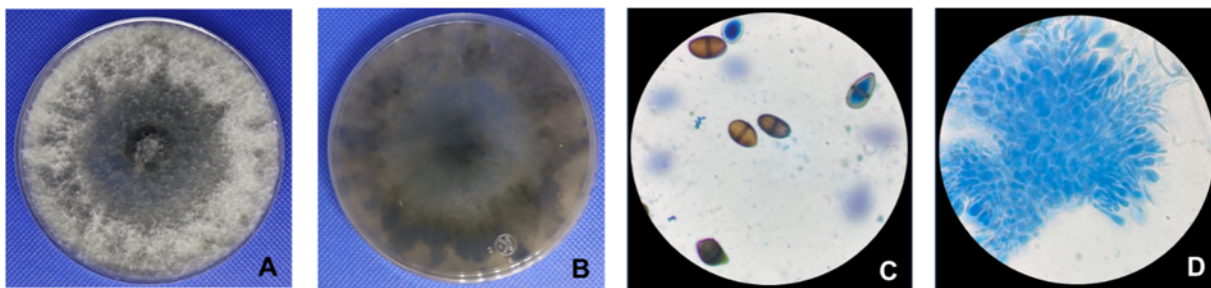


Figura 21: Aislado de *Lasiodiplodia* sp. en medio MEA; A) anverso de la colonia, B) reverso, C) conidios maduros y D) paráfisis.

Lasiodiplodia sp. en medio AV8: Por el anverso, colonias de aspecto algodonoso con rápido crecimiento micelial (10.07 mm por día), al inicio blancas, luego gris oliváceo y cuando maduran se tornan de color gris oscuro, hifas septadas y ramificadas de color gris oscuro a marrón. Picnidio globoso de color marrón oscuro con ornamentaciones, inmerso en el medio de cultivo. Paráfisis hialinas, cilíndricas, aseptadas, no ramificadas, extremos redondeados, forman picnidios de color negro. Conidios ovoides, hialinos unicelulares con contenido granular en su interior en estado inmaduro, de 20.0-327.5 x 12.5-15.0 μm cuando maduran son bicelulares, de color marrón oscuro, con estriaciones longitudinales (Figura 22).

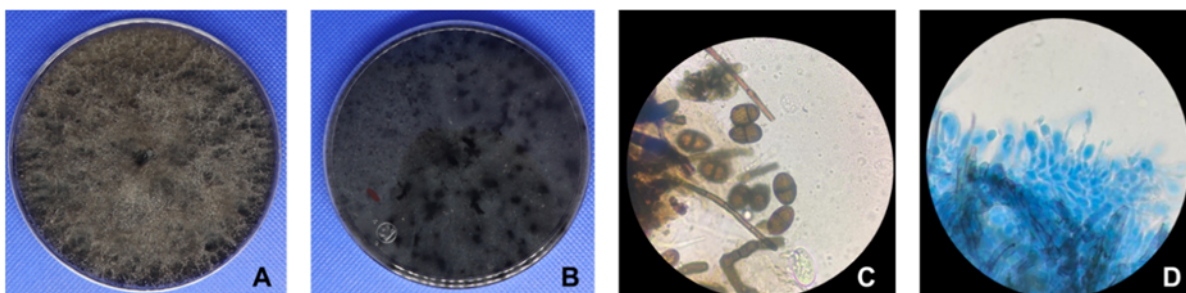


Figura 22: Aislado de *Lasiodiplodia* sp. en medio AV8; A) anverso de la colonia, B) reverso, C) conidios maduros y D) paráfisis.

Lasiodiplodia sp. en medio OMA: por el anverso colonias de apariencia algodonosa, al principio blancas translúcidas, las cuales con el tiempo se tornan blanco grisáceo a gris oscuro, picnidios oscuros inmersos en el medio de cultivo; conidios unicelulares hialinos y de contenido granuloso cuando jóvenes, al madurar bicelulares, de color marrón oscuro con estrías longitudinales y de ápices redondeados de 20.0-30.0 a 10.0-15.0 μm (Figura 23).

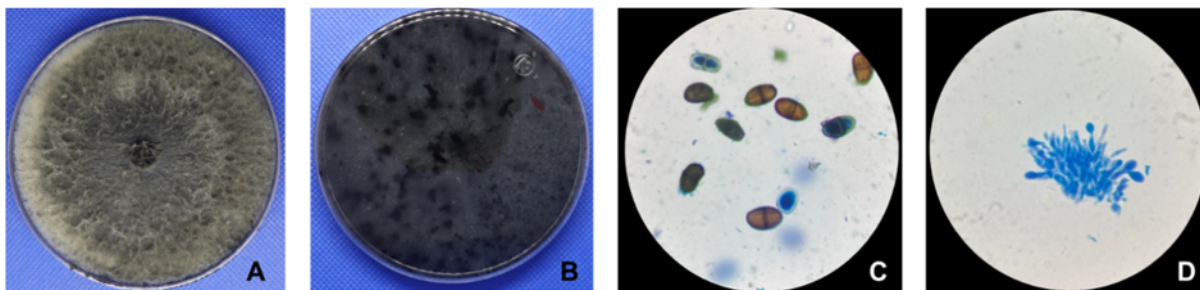


Figura 23: Aislado de *Lasiodiplodia* sp. en medio OMA; A) anverso de la colonia, B) reverso, C) conidios maduros y D) paráfisis.

Los valores de las dimensiones (μm) representan el promedio de 40 mediciones de conidios de seis aislados de *Lasiodiplodia* sp. (112, 121, 131, 154, 157 y 512) en forma respectiva, obtenidos de plantas de arándano en medio Agar Extracto de Malta (MEA), Agar V8 (AV8), Papa Dextrosa Agar (PDA) y Avena Agar (OMA).

Cuadro 3: Características morfométricas de conidios de seis aislados de *Lasiodiplodia subglobosa* obtenidos de arándano variedad Biloxi desarrolladas en cuatro medios de cultivo diferentes.

Med. Cult.	Aislado	Longitud (μm)	Ancho (μm)	Relación (L/A)(μm)	Septos
MEA	<i>L. subglobosa</i>	22.5-27.5	12.5-15	1.8	1
		25.30	14.09		
		1.95	1.22		
OMA	<i>L. subglobosa</i>	20.0-30.0	10.0-15.0	2	1
		25.37	13.23		
		2.47	1.50		
AV8	<i>L. subglobosa</i>	20.0-27.5	12.5-17.5	1.6	1
		23.54	13.72		
		2.16	1.38		
PDA	<i>L. subglobosa</i>	20.0-27.5	12.5-15.0	1.6	1
		24.09	13.84		
		2.15	1.26		

^xEl primero renglón muestra los rangos mínimos y máximos de la longitud de conidios; ^yEl segundo renglón muestra la media de 40 mediciones de conidios por aislado; ^z El tercer renglón indica la desviación estándar.

2.3.1. Crecimiento micelial de especies de *Lasiodiplodia* obtenidas de arándano variedad Biloxi en medio MEA OMA V8A Y PDA.

La tasa de crecimiento radial de micelio de los aislados de *L. subglobosa* en medio MEA no presentó diferencias significativas, los rangos de crecimiento fueron de 14.77 a 16.33 mm día⁻¹, con un valor de $P=0.05$. En el medio de cultivo OMA, el crecimiento varió de 8.58 a 11.92 mm día⁻¹, con diferencias significativas entre los diferentes

aislados, siendo el aislado M112 y M121, los que presentaron menor crecimiento (8.58-9.50 mm día⁻¹) con respecto al aislado M512 el cual mostró un crecimiento radial de 11.92 mm día⁻¹. De igual manera en medio V8A, el crecimiento radial varió de 8.08 mm día⁻¹ con el aislado M112 y 12.67 mm día⁻¹ del aislado M512, con diferencias significativas con un valor de P=0.05, sin embargo, en el medio PDA no se observaron diferencias significativas entre los diferentes aislados, con un rango de 13.83 a 17.17 mm/día con un valor de P=0.05.

Cuadro 4: Efecto de cuatro medios de cultivo en el crecimiento micelial de seis aislados de *Lasisodiplodia subglobosa* a 25 °C con fotoperiodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Especie / Aislado	Media / Crecimiento radial (mm día ⁻¹)			
	MEA ¹	OMA ²	AV8 ³	PDA ⁴
<i>L. subglobosa</i>				
M112	14.17 a	8.58 a	8.08 a	13.83 a
M121	14.33 a	9.50 a	9.42 ab	14.33 a
M131	14.33 a	10.08 ab	9.58 ab	14.67 a
M154	15.42 a	10.25 ab	10.17 ab	15.17 a
M157	15.50 a	10.33 ab	10.50 bc	15.67 a
M512	16.33 a	11.92 b	12.67 c	17.17 a

¹ MEA = Agar Extracto de Malta, ²OMA = Avena-Agar, ³V8A = Jugo V8 Agar y ⁴PDA = Papa Dextrosa Agar.

De los 173 aislados obtenidos de tallos de arándano con síntomas de muerte descendente, solo 58 fueron patogénicos en hojas desprendidas de arándano variedad Biloxi (Figura 4A). Es importante mencionar que los primeros síntomas se presentaron 72 h después de la inoculación y se manifestaron como manchas de color café claro alrededor del área inoculada, mismas que se extendieron hasta formar una mancha café de circular que varió de tamaño en los diferentes géneros, en lo referente al testigo sin inóculo, en este las hojas se mantuvieron sin daño por los siete días que duró el experimento (Figura 24B). Los datos sobre el porcentaje de medición del área foliar afectada se sometieron a un análisis de varianza no paramétrica y a una comparación de medias mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($P=0.05$). Dado que el valor p (.000) es menor que 0.05, tenemos pruebas suficientes para decir que hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de patogenicidad en las pruebas en hoja desprendida de los diferentes géneros (Figura 24B).

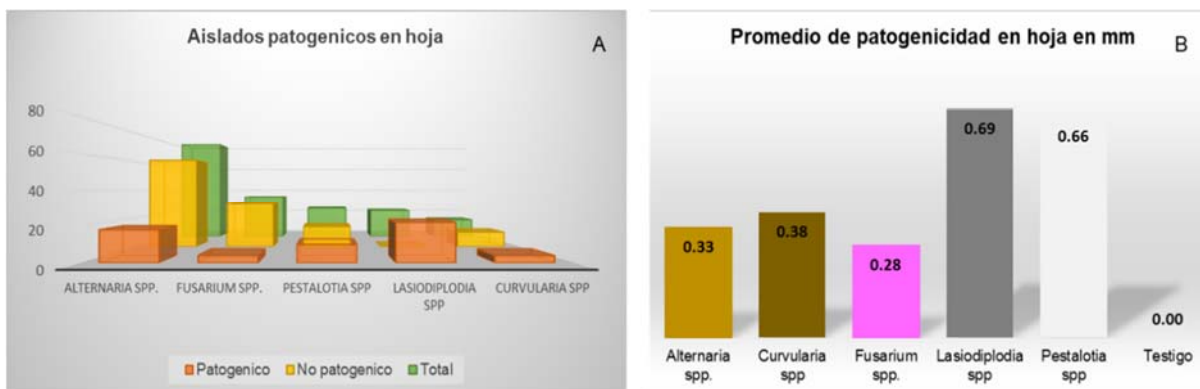


Figura 24: A) aislados patogénicos en hoja y B) Radio de área foliar afectada expresado en milímetros.

Del total de aislados evaluados en varetas, solo los correspondientes al género *Lasiodiplodia* fueron patogénicos en varetas, es importante mencionar que las primeras lesiones aparecieron siete días posteriores a la inoculación (Figura 25), al mismo tiempo las lesiones de los diferentes aislados de *Lasiodiplodia* presentaron diferencias significativas entre los diferentes aislados (Figura 26).

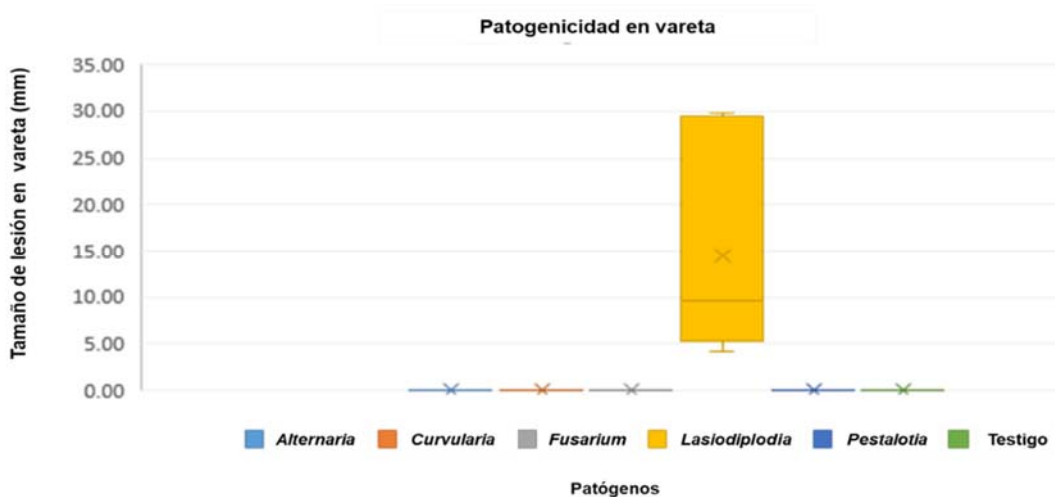


Figura 25: Pruebas de patogenicidad de los diferentes aislados en varetas.

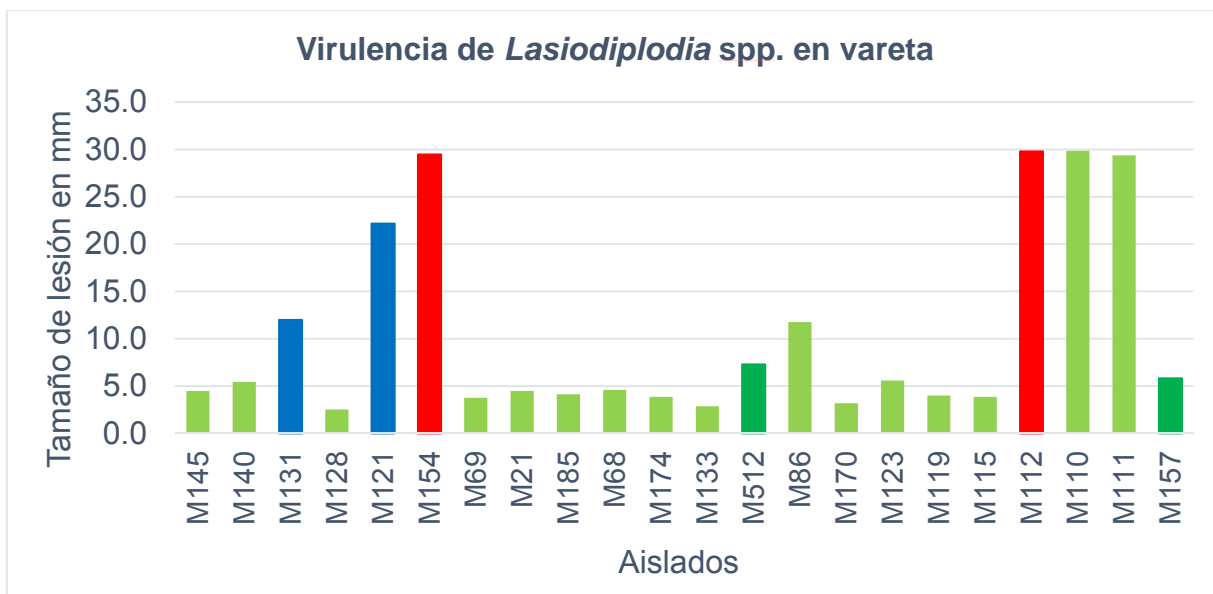


Figura 26: Longitud de lesión de *Lasiodiplodia* en varetas expresado en mm, nueve días después de la inoculación.

Las pruebas de incidencia por poda y sellado en planta se dejaron correr por dos meses y los primeros síntomas de muerte descendente aparecieron entre los 45 a 60 días. De los tres selladores que se probaron, con el sellador a base de pintura vinílica tipo plástico lavable los tallos podados no presentaron síntomas de muerte descendente, en tanto que los tallos sellados con pintura vinílica sola y el agua oxigenada se comportaron de manera similar en cortes de 45°; y en las plantas con ángulo de poda de 180° las plantas sin sellar presentaron síntomas más evidentes. Las plantas sin poda permanecieron sanas hasta el final del experimento (Figura 27).

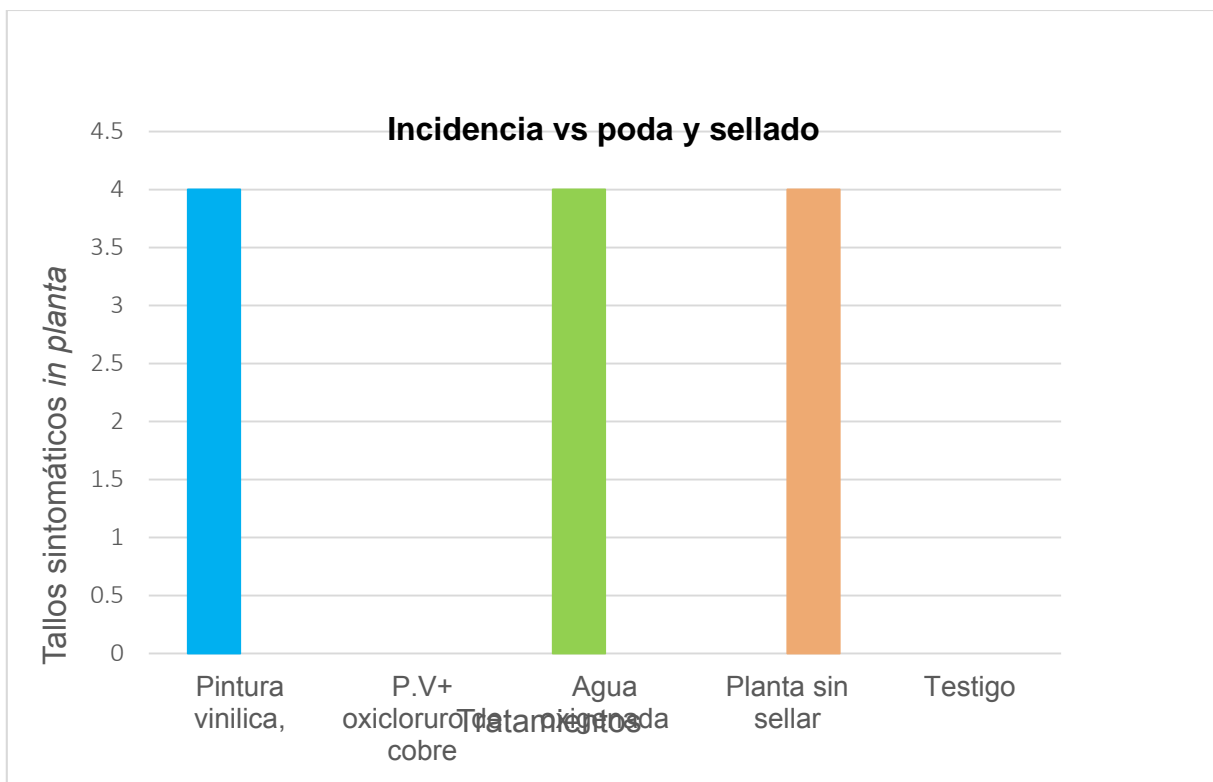


Figura 27: Presencia de síntomas de muerte descendente al evaluar in planta dos técnicas de poda y tres de sellado.

2.3.2. Discusión

El arándano es un cultivo de importancia económica para México, el cual es afectado por enfermedades como tizón del tallo, marchitez de puntas y muerte descendente. La familia Botryosphaeriaceae engloba varias especies de hongos que se encuentran en todas las zonas ambientales y climáticas del mundo como patógenos endófitos o saprófitos (Wang *et al.*, 2021). Los síntomas de muerte de retoños en especies de *Vaccinium* se han atribuido a *Phomopsis vaccinium* y *P. columnaris*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neopestalotiopsis* y *Colletotrichum acutatum* (Montiel-Frausto y Vásquez-López, 2021). *Lasiodiplodia* sp. es un género de hongos con amplia distribución que causa una variedad de enfermedades en regiones tropicales y subtropicales y que causa una variedad de enfermedades que incluyen canchros, muerte descendente, pudrición de la fruta o de la raíz, tizón de ramas, pudrición del extremo del tallo y gomosis en una amplia gama de árboles leñosos y frutales. Desde 2004 hasta 2017, se han descrito 43 especies de *Lasiodiplodia*, sin embargo, de forma reciente se han descubierto en China cinco nuevas especies de *Lasiodiplodia* asociadas con los arándanos (Wang *et al.*, 2021). En México, un estudio realizado por Martínez-Vivanco

et al. (2022), identifican morfológicamente a *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum* spp. y *Fusarium* spp., como agentes causales de la muerte descendente. Este tipo de daño es muy común en las áreas productoras de arándano, debido a las altas densidades de plantación, aunado a la práctica de poda, que es una de las más importantes en este cultivo, ya que cada fin de cosecha es necesario realizar esta actividad con el fin de mantener la calidad en la producción y prolongar la longevidad de los huertos. Los hongos de la madera comprometen la estabilidad de los huertos, debido a que se pueden presentar tanto en forma individual como formando complejos (Morales, 2017).

2.4. Conclusiones

En el presente trabajo se obtuvieron 173 aislados de hongos asociados a la muerte descendente del arándano, encontrando cuatro patógenos asociados a dicha enfermedad, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia* spp, *Pestalotia* spp. y *Lasiodiplodia* spp. (Barnett and Hunter, 1972 y Phillips *et al.*, 2013). Sin embargo, únicamente los aislados correspondientes a *Lasiodiplodia* sp. tiene correlación en las pruebas de patogenicidad en hoja y en vareta, mostrando en estos diferentes grados de virulencia, de tal modo que, colocan a *Lasiodiplodia* spp como el agente causal de la muerte descendente del arándano, Por otro lado, la caracterización cultural y conidial permiten ubicar a nivel de género, pero no a nivel de especie, lo que puede resultar en una identificación inexacta debido a la superposición morfológica, por lo que es indispensable recurrir a la identificación molecular y filogenia para separar las especies.

En la evaluación de los ángulos de poda, los primeros síntomas *in planta*, ocurrieron entre los 45 a 60 días y se presentaron a partir del área de corte hacia la base de los tallos que, en combinación con los selladores, mostraron diferencias significativas entre los tratamientos probados, siéndola pintura vinílica tipo plástico lavable más oxiclورو de cobre el que presentó mejores resultados en los dos ángulos de poda evaluados.

CAPÍTULO 3. Etiología de la muerte descendente del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en el norte de Sinaloa, México.

RESUMEN

Desde hace algunos años, la producción y el consumo de arándanos se ha incrementado a nivel mundial, esto a pesar de factores climáticos, escasos de mano de obra y costos de producción. A la par del incremento en la superficie que ocupa este cultivo, se han incrementado las enfermedades fungosas que afectan tanto calidad como producción; una de estas enfermedades es la muerte descendente del arándano, la cual se presenta posterior a la poda, mismas que se realizan después del trasplante y ya concluida la cosecha. El objetivo del presente trabajo fue identificar al agente causal de esta enfermedad. Para esto, se muestrearon cinco lotes comerciales de arándano, donde se obtuvieron seis aislados fúngicos, los cuales se identificaron de forma morfológica y molecular, y se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de arándano variedad Biloxi, confirmándose los postulados de Koch por el reisolamiento de los aislados de origen. De acuerdo con los análisis morfológicos de los aislados se encontró al género *Lasiodiplodia* asociado a la muerte descendente del arándano; el análisis filogenético, de los fragmentos de genes del factor de elongación de la traducción 1- α (TEF), el gen de la β -tubulina (*tub2*) y los fragmentos de genes del factor de elongación de la traducción 1- α (TEF), se consiguió la identificación de *Lasiodiplodia subglobosa* como agente causal de la muerte descendente del arándano en Sinaloa, la cual resultó patogénica en arándano variedad Biloxi, con diferentes grados de virulencia. Los resultados del presente trabajo, abren nuevas líneas de investigación respecto al impacto sobre otras variedades de arándano, así como su impacto en calidad y rendimiento a nivel local aunado a la posible afección de *L. subglobosa* hacia otros cultivos de importancia económica en la región.

ABSTRACT

For some years now, the production and consumption of blueberries has increased worldwide, despite climatic factors, labor shortages and production costs. Along with the increase in the surface area occupied by this crop, fungal diseases that affect both quality and production have increased; one of these diseases is blueberry dieback, which occurs after pruning, which is carried out after transplanting and once the harvest is finished. The objective of this work was to identify the causal agent of this disease. For this, five commercial batches of blueberries were sampled, where six fungal isolates were obtained, which were identified morphologically and molecularly, and pathogenicity tests were carried out on Biloxi variety blueberry plants, confirming Koch's postulates by the re-isolation of the original isolates. According to the morphological analysis of the isolates, the genus *Lasiodiplodia* was found to be associated with blueberry dieback; the phylogenetic analysis of the gene fragments of the translation elongation factor 1- α (TEF), the β -tubulin gene (*tub2*) and the gene fragments of the translation elongation factor 1- α (TEF), identified *Lasiodiplodia subglobosa* as the causal agent of blueberry dieback in Sinaloa, which was pathogenic in the Biloxi variety of blueberry, with different degrees of virulence. The results of this work open new lines of research regarding the impact on other blueberry varieties, as well as its impact on quality and yield at a local level, in addition to the possible affectation of *L. subglobosa* towards other crops of economic importance in the region.

3.1 Introducción

El uso de marcadores moleculares nos brinda ventajas para la identificación y estudio de la diversidad de las especies, al tiempo que nos dan más certeza sobre su evolución. La gran necesidad de hacer una correcta identificación, nos obliga a hacer uso adecuado de las diversas herramientas para realizar un adecuado análisis filogenético, lo que influye drásticamente en la sistemática y la taxonomía de muchos organismos. En lo referente a hongos fitopatógenos, como el género *Lasiodiplodia*, se hace uso de los espaciadores internos transcritos (ITS), parte del factor de elongación de traducción-1 α (*tef1*) y los datos parciales de la secuencia de β -tubulina (*tub2*) para investigar las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies, ya que en el caso la familia *Botryosphaeriaceae*, hay individuos con distinta morfología, pero por filogenia resultan hermanos (Bautista-Cruz *et al.*, 2019).

Botryosphaeriaceae forma un linaje monofilético con 22 géneros que se definen según la morfología de ascosporas y conidios, y las relaciones filogenéticas (Phillips *et al.*, 2019). La familia se caracteriza por ascosporas aseptadas grandes, de ovoides a oblongas, hialinas por lo común, y conidios hialinos o pigmentados, aseptados, uno o raramente multiseptados, de paredes gruesas, por lo general con estrías longitudinales. Al considerar los caracteres asexuales (conidios), las especies de *Lasiodiplodia* difieren de otros géneros muy relacionados en *Botryosphaeriaceae* por la presencia de paráfisis picnidiales y estrías longitudinales en los conidios maduros, mientras que la morfología (en especial las dimensiones) de los conidios y paráfisis se utilizan para la delimitación de especies (Abdollahzadeh *et al.*, 2010). La morfología por sí sola no es confiable para distinguir diferentes especies de *Lasiodiplodia*. Phillips *et al.* (2016), sugieren que la combinación de LSU e ITS proporciona una resolución confiable para la filogenia de *Botryosphaeriales*. Sin embargo, los genes codificantes de proteínas como *tef1* y *tub2*, además de LSU e ITS, proporcionan un mayor apoyo para la delimitación a nivel de especies y géneros.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Selección de aislados

La selección de los aislados para la identificación molecular, se realizó con base en los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad en vareta y la virulencia, por lo que se tomaron seis aislados al azar con diferentes grados de virulencia. La extracción de ADN de los aislados de *Lasiodiplodia* spp. obtenidos de tallos de arándano con síntomas de muerte descendente se realizó en el Laboratorio de Inocuidad Agroalimentaria, del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.

3.2.2 Extracción de ADN con CETAB.

El ADN se extrajo a partir de micelio de aislados de cuatro días de edad en medio PDA e incubados a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Con base en el protocolo del Kit de extracción de ADN vegetal CTAB SYNERGY™ 2.0 (OPS Diagnostics, EE.UU.) con algunas modificaciones.

Se colocaron 100 mg de micelio en un vial de 1.5 mL y se agregaron 500 μL de buffer CTAB (3% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 100mM Tris H pH 8, 0.2% Mercaptoetanol 0.2% y Agua ultra pura), en seguida se mezcló y se llevó a baño María a 65°C durante 20 minutos, en seguida se maceró con un pistilo para microtubos y se centrifugó a 13,000 rpm durante dos minutos; el sobrenadante se recuperó y se añadió un volumen de 600 μL de cloroformo/alcohol (24:1), se mezcló por inversión 3 o 4 veces para centrifugar de nuevo a 13000 rpm por 10 minutos. De la fase acuosa se recuperaron 300 a 400 μL , que fueron transferidos a un vial nuevo de 1.5 mL, y se agregó un volumen 500 μL de isopropanol frío, se mezcló por inversión 3 o 4 veces y se incubó a -20°C durante 10 minutos para precipitar el DNA, después el vial se centrifugó a 14,000 rpm por ocho minutos; en seguida el sobrenadante se decantó sin perder el pellet y se agregaron 500 μL de etanol frío al 70% para disolver, en seguida se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos y se decantó el sobrenadante sin alterar el pellet, se dejó secar a temperatura ambiente de laboratorio, para eliminar el alcohol y se agregaron 50 μL de agua ultrapura para resuspender y se almacenaron a -20°C . La cuantificación del ADN se llevó a cabo con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Cuadro 4).

3.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación de los aislados a nivel especie se recurrió a la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), como complemento de las características morfológicas, con la cual se realizó la amplificación de algunas regiones del genoma que codifican para diferentes proteínas; la región completa de los espaciadores internos transcritos (ITS) ITS1- (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4- (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) que amplifica de 650 a 750 pb; el gen del factor de elongación de la traducción 1-alfa (*tef1- α*) EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG-3') y EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'); además de EF1-688 (5'-CGGTCACTTGATCTACAAGTGC-3') y EF1-1251R (5'-CCTCGAACTCACCAGTACCG) que amplifican para 334 a 350 pb (Alves *et al.*, 2008). y el gen de la β -tubulina (*tub2*) β t2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y β t2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') que amplifican para 650 a pb (Glass y Donaldson, 1995). La mezcla de reacción para 1X consistió en: agua ultra pura 17.25 μ L; buffer IDX 2.5 μ L; MgCl 50 μ M 0.75 μ L; dNTPS 10 μ M 1.25 μ L; primer 1 1 μ L; primer 2 1 μ L y DNA TAQpol (5 μ /mL) 0.25 μ L, para cada uno de los iniciadores utilizados, dando un volumen final de 24 μ L de mix para PCR al cual se le adicionó 1 μ L de DNA para obtener un volumen final de 25 μ L, este mix se realizó para cada uno de los pares de iniciadores, aunque en el caso particular de EF, se adicionó 1 μ L de DMSO al 1% por mix de 25 μ L para mejorar la amplificación de algunas plantillas de DNA difíciles. Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados por T4 Oligo/DNA Artificial (Irapuato, Gto., México).

3.2.4 Electroforesis

Los amplicones resultantes fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa-TAE 1X al 2.5 (400-600 pb) y 0.8% (600 pb 3.0 kb) tienen diferente tinte con Tinte: ADN SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™ S33102 thermofisher. USA). La fuente de poder se programó a 100 Voltios, 400 Amperes y un tiempo de 25 minutos (Figura 28).



Figura 28: Extracción de ADN de acuerdo con el protocolo CTAB Kit de extracción basado en CTAB SYNERGY™ 2.0, cuantificación, amplificación y visualización en gel de agarosa.

3.2.5 Purificación de productos de PCR

La purificación del ADN de productos de PCR se llevó a cabo con base en el protocolo QIA Quick PCR Purification Kit (250) Cat. No. 28106. Primero se agregaron 5 volúmenes de Buffer PB por cada volumen de reacción de PCR; la mezcla se colocó en una columna QIA quick y se centrifugó a 13,000 rpm por un min (para que el ADN se una a la columna) y se decantó el líquido que pasó por la columna; para lavar se agregaron 750 μ l de Buffer PEA a la columna y se dejó reposar por un min; luego se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min, se decantó el líquido que pasó por la columna y centrifugó de nuevo a 13,000 rpm por un min para secar la columna; enseguida, se colocó un tubo nuevo y limpio de 1.5 mL, para eluir el ADN, por lo que se agregaron 40 μ L de H₂O UP tibia (50°C), se dejó en reposo por 2 minutos y de inmediato se centrifugó a 13,000 rpm por un min. Por último, se desechó la columna y el ADN purificado se almacenó a -20°C. La cuantificación de los productos de PCR purificados se llevó a cabo con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c. (Cuadros 5 y 6) para verificar la pureza y concentraciones finales. Los amplicones resultantes fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa-TAE 1X al 0.8 y 1.5%.

3.2.6 Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR se realizó en el Laboratorio Nacional De Biotecnología Agrícola, Médica Y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

3.2.7 Dendograma o árbol filogenético

Para los estudios filogenéticos, de los marcadores moleculares ITS, Bt y EF, se realizó la búsqueda ortopédica con un script de Biopython con NCBIWWW, con un parámetro de valor p de 1E-20. Para la asignación a nivel de especie se consideraron los 10 resultados con relación más estrecha y ordenados por preferencia de acuerdo con el valor mínimo de BLAST, para lo que se estableció como umbral un mínimo de 98% de cobertura y un 98.5% de porcentaje de identidad con una secuencia de referencia. Los resultados de BLAST se procesaron con Python y Perl scripts para facilitar múltiples alineaciones. El programa Mafft v.7.475 (Yamada *et al.*, 2016), se empleó para obtener alineaciones múltiples con los parámetros --reorder--auto. Cada alineación fue editada con Trimal v. 1.4.rev 22 (Capella-Gutiérrez, 2009) con el Parámetros -gt 0,3 -st 0,001. Se empleó el script Fasta_to_phylip.py para convertir a formato Phylip (<https://github.com/josephhughes/Sequence-manipulation>), y los árboles filogenéticos se construyeron con RaxML v. 8.2.12 (Stamatakis 2014), con los siguientes parámetros: -f a -T 15 -m GTRGAMMA -N 100 -x 12345 -p 54321. Con los datos anteriores se realizó un análisis con el método Heurístico con el software Clann (<https://github.com/ChrisCreevey/clann>) para la construcción de un súper árbol; por último, el árbol se trazó con iTOL (<https://itol.embl.de/login.cgi>).

3.3 Pruebas de patogenicidad inducida en planta de arándano

La patogenicidad de seis aislados representativos se evaluó en plantas sanas de arándano variedad Biloxi de dos años de edad. La inoculación se realizó con el método de disco de micelio en tallo (O'Gara *et al.*, 1996) con algunas modificaciones. Las plantas de arándano se establecieron en macetas de plástico de 18 L de capacidad con sustrato de fibra de coco, con pH de 4.8 a 5.0, sus requerimientos hídricos y de fertilización se cubrieron a diario con Miracle-Gro (The Scotts Company LLC; Marysville, Ohio, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los tallos de las plantas se sanitizaron al frotar con un algodón empapado en alcohol al 70%, luego se envolvió con un algodón empapado en hipoclorito de sodio (1:3) por un tiempo

de 3 minutos y se enjuagó por tres ocasiones con agua destilada estéril; con una tijera de podar se realizó un corte a 45°, sobre la zona de corte se colocó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con micelio activo de siete días de edad, al final se cubrió con cinta termoelástica moldeable resistente a la humedad (ParaFilm M) para envolver al tallo y el disco de PDA, con el fin de mantener la humedad. El tratamiento control se realizó con el mismo procedimiento, pero con un disco de PDA sin colonizar. Todo esto se llevó a cabo bajo condiciones asépticas. El experimento se condujo en dos ocasiones bajo condiciones normales de luz y temperatura, con una duración de 30 días.

3.4 Resultados

Con el método CTAB, se obtuvo ADN de buena calidad, con un rango de concentración de 169.4 a 236 µg/µL y una pureza (260/280) de 2.1 a 2.16 y de 2.0 a 2.12 (260/230) todos cuantificados con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

Cuadro 5: Lecturas de concentración y pureza (260/280 y 260/230) de ADN extraído por el método CTAB

Cuantificación de ADN				
Aislado	Concentración	Unidad	260/280 ^Y	260/230 ^Z
M112	203.8	µg/µL	2.14	2.00
M121	203.9	µg/µL	2.13	2.06
M131	169.4	µg/µL	2.13	2.00
M154	203.8	µg/µL	2.10	2.12
M157	202.3	µg/µL	2.17	2.01
M512	236.2	µg/µL	2.16	2.01

^Y260/280: valor ideal 1.8-2.1, valores por abajo del rango pueden indicar presencia de proteínas y por arriba de este puede ser presencia de ARN.

^Z260/230: valor ideal de 2.0 a 2.2, valores por debajo de este rango son indicativos de contaminantes como fenol.

Los productos de PCR fueron para ITS y EF de 550 pb mientras que para Bt de 450 pb (Figuras 29 y 30)

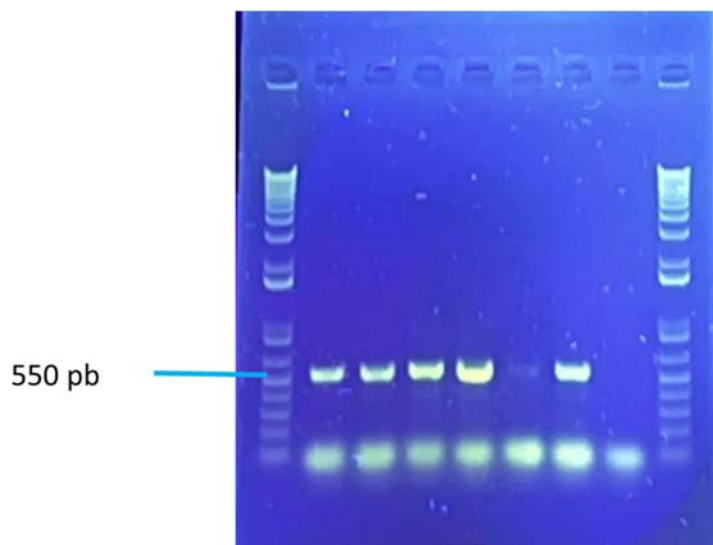
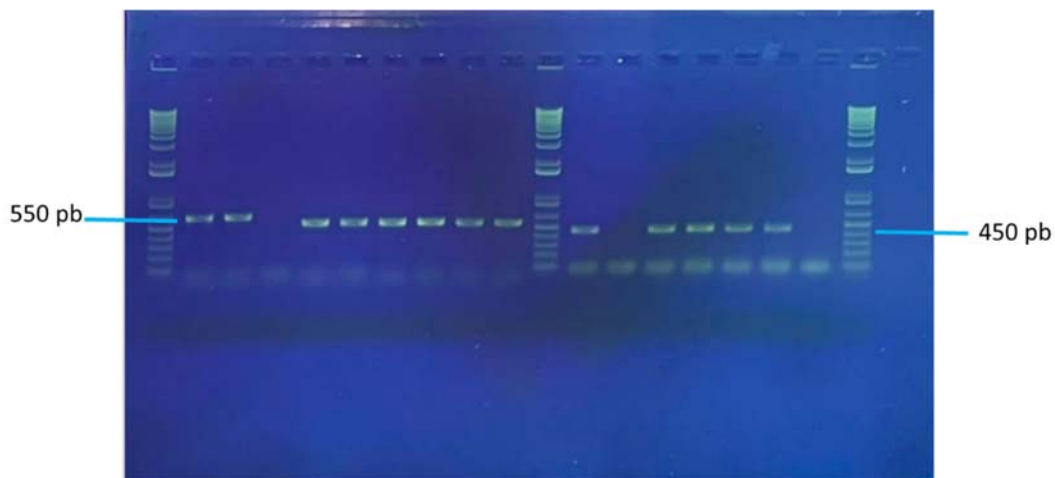


Figura 30: Gel de electroforesis en agarosa al 0.8 % con amplificación de muestras de *Lasiodiplodia* sp. para EF 550 pb. Carril 2 a 7 y carril 8 control negativo. Marcador de peso molecular 1kb.

La pureza, calidad y concentración (Cuadros 5 y 6) final de los productos de PCR se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c, y se obtuvo un volumen requerido de 20 μ L para la secuenciación.

Cuadro 6: Cuantificación de pureza final de productos de PCR purificados para enviar a secuenciación.

Muestra	Pureza final 260/280		
	ITS1 / ITS4	Bt2a / Bt2b	EF1-688F / EF1-1251R
M-112	1.86	1.85	1.90
M-121	1.86	1.01	1.91
M-131	1.91	1.94	1.89
M-154	1.83	1.96	1.88
M-157	1.89	1.91	1.85
M-512	1.91	1.86	1.88

Cuadro 7: Concentración final de productos de PCR purificados para enviar a secuenciación.

Muestra	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (vol. 20 μL)		
	ITS1 / ITS4	Bt2a / Bt2b	EF1-688F / EF1-1251R
M-112	53.70	28.40	21.20
M-121	46.70	20.80	29.00
M-131	56.00	22.60	25.30
M-154	59.80	24.50	30.50
M-157	54.10	21.90	8.90
M-512	32.40	20.10	23.80

Los aislados de las especies de *Lasiodiplodia* se identificaron a partir de los análisis filogenéticos del método de estimación de parámetros *Maximun Likelihood* con 1,000 repeticiones y el modelo GTRGAMMA de la región completa ITS (ITS1/ITS4) y partes de los genes EF1 (EF1-688F y EF1-1251R) y Bt2 (Bt2a y Bt2b). Los conjuntos de datos combinados de ITS, EF1 y BT2 consideraron 100 taxones, incluyendo un grupo externo. De acuerdo con la filogenia se obtuvieron clados bien definidos correspondientes a especies de *Lasiodiplodia* sp. con descripción previa, donde se agruparon los aislados M112, M121, M131, M157, M154 y M512 en el mismo nodo por lo que se considera a *Lasiodiplodia subglobosa* como la especie causante de la muerte descendente del arándano variedad Biloxi (Figura 31).

Los análisis filogenéticos confirmaron la identidad de los aislados a nivel género; la comparación de las secuencias en la base de datos del GenBank mostró altos porcentajes de similitud con una especie de *Lasiodiplodia*; los M112, M121, M131,

Los aislados obtenidos de tallos con síntomas de Muerte descendente, resultaron patogénicos en arándano variedad Biloxi y causaron síntomas similares a los observados en campo (Figura 32). Treinta días después de la inoculación, en los experimentos I y II los tallos inoculados con los aislados de *Lasiodiplodia subglobosa* presentaron diferentes grados de virulencia; los más afectados fueron los tallos inoculados con el aislado M-112 y los que resultaron con menos daño fueron los inoculados con el aislado M-157 (Cuadro 7). En ambos experimentos el tratamiento control no presentó síntomas durante el tiempo que duró el experimento.

Para dar cumplimiento a los postulados de Koch, se realizaron reaislamientos de los síntomas de tallos de las plantas inoculadas, los estudios morfométricos de 15 conidios por aislado, así como, las características fenotípicas de las colonias obtenidas, corresponden a las características de los aislados de origen, con lo que se confirma la identidad de los mismos.



Figura 32: A) Síntomas de Muerte descendente del arándano a partir de infección natural en campo; B) tallo recién inoculado; C) tallo inoculado con síntoma, característico de muerte descendente, causados por *Lasiodiplodia subglobosa* (aislado M-112) y D) tallo asintomático de tratamiento control.

Cuadro 8: Longitud media de la lesión en milímetros sobre tallos de arándano variedad Biloxi inoculadas con aislados de *Lasiodiplodia subglobosa*.

	Especie/Aislado	Experimento 1		Experimento 2	
^x La	<i>L. subglobosa</i> M-112 ^x	12.25 ^Z	a	11.50	a
	<i>L. subglobosa</i> M-121	9.50	b	8.75	bc
	<i>L. subglobosa</i> M-131	8.50	b	9.00	b
	<i>L. subglobosa</i> M-154	9.75	b	9.50	b
	<i>L. subglobosa</i> M-157	0.40	d	0.50	d
	<i>L. subglobosa</i> M-512	7.25	c	7.75	c
	Control	0.00	d	0.00	d
	CV	50.97		48.51	

patogenicidad de los aislados se evaluó 30 días después de la inoculación.

^ZMedias con la misma letra en cada columna no son diferentes en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

3.5 Discusión

El tizón del tallo y muerte descendente fueron registrados por primera vez en México en 2012, dando origen a severas afectaciones en el cultivo de arándano en los estados de Michoacán y Jalisco, los estudios filogenéticos realizados identificaron a *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum* como el agente causal de estas enfermedades (Boyzo-Marin *et al.*, 2016). Los síntomas observados en el presente estudio son muy similares a los causados por estas especies, sin embargo, el estudio filogenético identifica a *Lasiodiplodia subglobosa* como agente causal de la muerte descendente del arándano en la región norte de Sinaloa. *L. subglobosa* fue descrita por primera vez en Brasil, como una nueva enfermedad del piñón aceitero (*Jatropha curcas*), miembro de la familia Euphorbiaceae (Machado *et al.*, 2014), y dos años más tarde Poletto *et al.* (2016), reportan por primera vez a *L. subglobosa* en síntomas de cancro del tallo en nogal (*Carya illinoensis*; familia Juglandaceae), en el estado de Rio Grande do Sul, con pérdidas de hasta un 100% de las plantas sintomáticas. En México realizó el primer reporte de esta especie fuera de Brasil, en plantas jóvenes de limón persa, y con base a las pruebas de patogenicidad se concluyó que fue la especie más virulenta de todas las probadas en este cultivo (Bautista-Cruz *et al.*, 2019).

3.6 Conclusiones

La amplificación de los fragmentos ITS 1 y 5 (Secuencias representativas del gen β -tubulina (*tub2*) β t2a y β t2b y el gen del factor de elongación de la traducción 1-alfa (*tef1- α*) permitieron la confirmación de la identidad de *Lasiodiplodia subglobosa*, asociado de manera consistente a la muerte descendente del arándano, la cual se presenta a partir de las diferentes podas realizadas al cultivo.

Este es el primer reporte de la etiología de *Lasiodiplodia subglobosa*, asociada a la muerte descendente del arándano en México, lo que abre la posibilidad enfocar futuras líneas de investigación para determinar su posible patogenicidad en otros frutales como mango y cítricos importantes en la región.

CAPÍTULO 4. LITERATURA CITADA.

Abdollahzadeh J., Javadi, A., Goltapeh, E.M., Zare, R. y Phillips A.J.L. 2010. Filogenia y morfología de cuatro nuevas especies de *Lasiodiplodia* de Irán. *Persoonia*.; *Mateo* 25:1–10. doi:10.3767/003158510X524150.

Alexandre Reis Machado, A.R., Batista, P.D. y Liparini Pereira, O.L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. 2014. Mushroom Research Foundation. DOI 10.1007/s13225-013-0274-1

Alves, A., Crous, P.W., Correia, A. and Phillips, A.J.L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. 2008. *Fungal Diversity*. 28: 1-13. Disponible en línea en: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>

Alves, A.; Correia, A. and Phillips, A. J. L. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species. 2006. *Fungal Diversity*. 23(1):1-15.

Arencibia-Arrebola, D.F., Luis Alfredo Rosario-Fernández, L.A., Gámez-Menéndez, R. 2008. Métodos generales de conservación de microorganismos. Centro de Productos

Naturales, Centro de Química Farmacéutica. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/262724715>

Arnedo, M. y Carranza, S. (2011) Eines moleculars per a l'estudi de la diversitat biològica. Elscursos naturalistes de la ICHN. Can Jordà (Santa Pau).

Asagrín, Asesorías agrícolas y Agroindustriales. 2007. Estrategias regionales de competitividad por rubro, Berries región de OHIGGINS. Instituto de desarrollo agropecuario. Disponible en línea: http://www.indap.gob.cl/docs/defaultsource/default-document-ibrary/berriesvir_estrategiasregionalesxrubro.pdf?sfvrsn=0

Ayala, L. A., Rodríguez, R., Aguilar, C. N., Lara, F. y Quero, A. R. 2004. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* usando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Fitopatología Mexicana* 22(2):239-245.

Bañados, P., Donnay, D. y Uribe, P. Poda en verde en arándanos. Pontificia Universidad Católica de Chile. 2007. *Agronomía y forestal*. 31: 16-19. Disponible en: https://agronomia.uc.cl/component/com_sobipro/Itemid,232/pid,118/sid,748/

Barnett, H.L., and Hunter, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Third edition. 1972. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. 241p.

Bautista-Cruz, M.A., Almaguer-Vargas, G., Leyva-Mir, S.G., Colinas-León, M.T., Correia, K.C., Camacho-Tapia, M., Robles-Yerena, L., Michereff, S.J. and Tovar-Pedraza, J.M. Phylogeny, Distribution, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Species Associated With Cankers and Dieback Symptoms of Persian Lime in Mexico. 2019. Published Online: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1036-RE>

Berbee, M., Pirseyedi, M., and Hubbard, S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase gene sequences. 1999. *Mycologia* 91(6): 964-977.

Bernal-Astorga, A. 2010. "Arándano: Perfil Comercial". Secretaría de Desarrollo Rural, dirección de Comercialización y Planeación del estado de Colima.

Boyzo-Marin, J., Rebollar-Alviter, A. Silva-Rojas, H.V. and Ramirez-Maldonado, G. First Report of *Neofusicoccum parvum* Causing Stem Blight and Dieback of Blueberry in Mexico. 2016. Published Online: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0381-PDN>

Bragard, C., Baptista, P., Chatzivassiliou, E., Di Serio, F., Gonthier, P., Jaques-Miret, J.A., Fejer-Justesen, A., MacLeod, A., Magnusson, C.S., Milonas, P., Navas-Cortes, J.A., Parnell, S., Potting, R., Stefani, E., Thulke, H-H., Van der Werf, W., Civera, A.V., Yuen, J., Zappala, L., Migheli, Q., Vloutoglou, I., Maiorano, A., Streissl, F. and Reignaul, P.L. Pest categorisation of *Lasiodiplodia pseudoteobromae*. 2023. EFSA Panel on Plant Health (PLH). SCIENTIFIC OPINION. EFSA JOURNAL;21(1):7737, 60 pp. doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7737

Concha-Meyer, A., Eifert, J.D., Williams, R.C., Marcy, J.E., and Welbaum, G.E. 2015. Shelf Life Determination of Fresh Blueberries (*Vaccinium corymbosum*) Stored under Controlled Atmosphere and Ozone. 2015. International Journal of Food Science Vol. (9), ID 164143. Disponible en: [dx.doi.org/10.1155/2015/164143](https://doi.org/10.1155/2015/164143)

De la Mora-Castañeda, J.G., Cibrián-Tovar, D., Omar A. Pérez-Vera, O.A. *Neofusicoccum eucalyptorum* (= *Botryosphaeria eucalyptorum*) Y *N. parvum*: PATÓGENOS EN PLANTACIONES DE EUCALIPTO EN MÉXICO. 2014. División de Ciencias Forestales (Departamento de Ecología y Silvicultura), Universidad Autónoma Chapingo. 187-197

De-Wet, J.; Burgess, T.; Slippers, B.; Preisig, O.; Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. 2003. Mycol. Res. 107(5):557-566. doi.org/10.1017/S0953756203007706.

EPPO. Data Sheets on Quarantine Pests *Colletotrichum acutatum*. 2003. EPPO, E.U.A.

Espinoza, J.G., Briceño, E.X., Chávez, E.R., Úrbez-Torres, J.R., y Latorre, B.A. *Neofusicoccum* spp. Asociado con el cancro del tallo y la muerte regresiva del arándano en Chile. 2009. Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1187>

Fabrega, A., Agut, M., Calvo, M.A. El género *Alternaria*: características morfológicas y capacidad de producción de micotoxinas. 2002. Anales de la Real Academia de Doctores Volumen (6): 357-367.

FAOSTAT. Datos sobre alimentación y agricultura. 2023. <https://www.fao.org/faostat/es/#data>

Flores-Hernández, H., Flores-Gracia, J., Varela-Fuentes, S.E., Pérez-Rodríguez, A., Azuara-Domínguez, A. y Monteon-Ojeda, A. Reporte de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. en árboles cítricos de Tamaulipas. 2021. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 12:3. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2640>.

Foolad, M.R., Ntahimpera, N., Chist, B.J., and Lin, G. Y. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. 2000. Plant Dis. 84:967-972.

France, I.A. Manejo de enfermedades del arándano. En Boletín técnico No. 371: Manual de manejo agronómico del arándano. 2017. INIA Instituto de Desarrollo Agropecuario - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Santiago de Chile. .6:55-70. Disponible en línea en: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/7627/NR39099.pdf?sequence=13>

French, E. R. y Hebert, T. Métodos de Investigación Fitopatológica. 1980. San José, Costa Rica. p. 176.

García J. F., Lawrence D. P., Morales-Cruz A., Travadon R., Minio A., Hernández-Martínez R. Filogenómica de especies de *Botryosphaeriaceae* asociadas a plantas. 2021. Microbiol. 12:652802.10.3389/fmicb.2021.652802

García, G.; Rubio, J.C.; Orientaciones para el cultivo de arándano, 2005. Disponible en línea en: http://www.naviaporcia.com/images/documentos/documento_173.pdf

García, R.J.C y García, G.G. Cultivo del arándano en Asturias. Servicio regional de investigación y desarrollo agroalimentario. 2011. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino.

Garrido, C.M.V. y Perez-Urria, C.E. Arándano rojo I (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). 2014. Reduca (Biología). Serie Botánica. 7 (2): 100-112. Universidad Complutense de Madrid. Departamento Biología. Madrid, España. Disponible en: <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/302eb71c-1eb2-4128-83c6-3b122be097c4/content>

Glass, N L., and Donaldson, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323-1330.

Gómez, M. B. C., Zúñiga, G. M., Vera, C. J. M. y Álvarez, R. B. A. *Biología Molecular, fundamentos y aplicación en las ciencias de la salud.* 2013. *Secuenciación del ADN.* 17:174-184.

González-Razo, F.J., Rebollar-Rebollar, S., Hernández-Martínez, J., Morales-Hernández, J.L., y Ramírez-Abarca, O. SITUACION ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE LA PRODUCCIÓN DE BERRIES EN MÉXICO. 2019. *Revista Mexicana de Agronegocios.* 44. Sociedad Mexicana de Administración Agropecuaria A.C., México. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14161295012>

Gough, R.E. *The Highbush Blueberry and its Management.* 1994. Food Products Press. Binghamton, NY, USA. Disponible en: doi.org/10.1201/9781482298000

Granados-Montero, M. *Identificación morfológica de hongos fitopatógenos.* 2018. Universidad de Costa Rica. 42p.

Hopple, J., R. Vilgalys, Phylogenetic relationships in the mushroom genus *Coprinus* and dark-spored allies based on sequence data from the nuclear gene coding for the large ribosomal subunit RNA: divergent domains, outgroups, and monophyly. 1999. *Molecular Phylogenetics Evolution* 13: 1-19.

Kelly KL and Judd DE. *Color Universal language and dictionary of names.* 1976. National Bureau of standards (U.S.). Special publication 440. 184p.

Kim, Y.K., Xiao, C.K., Rogers, J.D. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphareopsis pyripitrescens*. 2005. *Mycologia* 97(1): 25-32.

Kopystecka, A., Koziół, II., Radomska, D., Bielawski, K., Bielawska, A., y Wujec, M. *Vaccinium uliginosum* y *Vaccinium myrtillus*, dos especies, una utilizada como alimento funcional. 2023. *Nutrientes*. 15(19): 4119. doi: 10.3390/nu15194119

Kovaleski, A.P., Williamson, J.G, Olmstead, J.W., Darnell, R.L. Inflorescence Bud Initiation, Development, and Bloom in Two Southern Highbush Blueberry Cultivars. 2015. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 140(1):38–44.

Luteyn J, Judd WS, Clemants SE, Diggs GM, Sorensen P, Dorr LJ, Wallace G. *Flora neotrópica: Monograph 66 Ericaceae part II the superior-ovaryed genera*. 1995. The New York Botanical Garden, New York. USA. 560p.

Luteyn J. *Ericaceae*. En: Buck W, Daniel T. *Flora genérica de los páramos: Guía ilustrada de las plantas vasculares*. 2005. The New York Botanical Garden Press. Bronx, New York. USA. 499.

Machado, A. R., Pinho, D. B., and Pereira, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. 2014. *Fungal Divers.* 67:231-247. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0274-1>

Maraite, M., Zinno, T.D., Longree, H., Daumerie, V., Duveiller, E. Fungi associated with foliar blight of wheat in warm areas. 1997. In: Duveiller E, Duvin HJ, Reeves J, and MacNab A (eds). *Helminthosporium blight of wheat: Spot blotch and tan spot*. CIMMYT. 293-300p.

Martínez-Vivanco, A.K., Pineda-Pineda, J., Rebollar-Alviter, A., Leyva-Mir, S.G. y Castillo-Márquez, L.E. Prospección de hongos asociados a tizón de tallo y muerte regresiva del arándano (*Vaccinium* spp.) y su relación con las propiedades fisicoquímicas del sustrato. 2022. Repositorio Chapingo. Universidad Autónoma Chapingo. Disponible en: <https://repositorio.chapingo.edu.mx/items/ba238b5f-0fc3-4ba2-b6d4-cfe4e568b228/full>

Maticorena-Quispe, M.F. y Escobedo-Álvarez, J.A. Cinco Tipos de Poda en Arándano (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi) y su Influencia en Determinados. 2024.

Parámetros Productivos. Ciencia Latina, Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México. Vol. 8(3). DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i3.11543

Mesa, P. Algunos aspectos de la fenología, el crecimiento y la producción de dos cultivadores de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. x *V. darowii*) plantados en guasca Cundinamarca, Colombia. 2015. Universidad militar nueva granada; Facultas de ciencias básicas y aplicadas; Programa de biología aplicada.Colombia.

Miles, T y Schilder, A. Arándanos de MI: Anotaciones: Pudrición de la fruta por Antracnosis (Pudrición de la madurez). 2022. Departamento de Ciencias de Planta, Suelo y Microbiales, Universidad Estatal de Michigan. Traducción y edición: Anamaría Gómez-Rodas, Carlos García-Salazar, Departamento de Extensión de la Universidad Estatal de Michigan. Disponible en line en: <https://www.canr.msu.edu/resources/pudrici-n-de-la-fruta-por-antracnosis-pudrici-n-de-la-madurez-e3039->

Mondragón, F.A., López, M.J., Ochoa, A.S, y Gutiérrez C.M. Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México. 2012. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Rev. mex. Fitopatología 30:2. On-line ISSN 2007-8080. Versión impresa ISSN 0185-3309

Montiel-Frausto, L.B. y Vásquez-López, A. *Botrytis cinerea*, AGENTE CAUSAL DE MUERTE DE RETOÑOS DE *Vaccinium corymbosum* L. CV. BILOXI EN OAXACA, MÉXICO. 2021. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 44 (2): 261 – 264. Disponible en línea en: <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/44-2/14a.pdf>

Morales, A.C.G. Manual de manejo agronómico del arándano. Instituto de desarrollo agropecuario- Instituto de investigación agropecuaria. 2017. Boletín INIA no. Santiago, Chile. 6:48-61.

Murray M. G., Thompson W. F. Aislamiento rápido de ADN vegetal de alto peso molecular. 1980. Ácidos nucleicos Res. 8 4321–4325. 10.1093/nar/8.19.4321

Nakasone, K., Peterson, S., & Jong, S.C. Preservation and distribution of fungal cultures. 2004. *Biodiversity of Fungi*, 37–47. doi.org/10.1016/B978-0-12509551-8/50006-4

Netto, M. S. B.; Lima, W. G.; Correia, K. C.; Da Silva, CH. F. B.; Thon, M.; Martins, R. B.; Miller, R. N. G.; Michereff, S. J. and Camara, M. P. S. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of anacardium in Brazil, with a new species of Lasiodiplodia. 2017. *Fungal Biol.* 121(4):437-451. Doi: 10.1016/j.funbio.2016.07.006.

O’Gara E., Hardy G.E.S. and Mc Comb J.A. The ability of *Phytophthora cinnamomi* to infect through wounded periderm tissue of *Eucalyptus marginata*. 1996. *Plant Pathology* 45:955-963. dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1996.tb02906.x

Peever, T. L., Olsen, L., Ibañez, A., and Timmer, L. W. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine × grapefruit hybrids in Florida. 2000. *Phytopathology* 90:407-414.

Pescie, M., Borda, M., Fedyszak, P., López, C. Efecto del momento y tipo de poda sobre el rendimiento y calidad del fruto en arándano altos del sur (*Vaccinium corymbosum*) var. O’Neal en la provincia de Buenos Aires. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 2011. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Argentina. 37(3): 268-274.

Phillips A. J., Alves A., Abdollahzadeh J., Slippers B., Wingfield M. J., Groenewald J. Z. Las Botryosphaeriaceae: géneros y especies conocidos por cultivo. 2013. *Stud. Mycol.* 76 51-167. 10.3114/sim0021

Phillips, A.J., Hyde, K.D., Alves, A., y Liu, J.K. Familias en Botryosphaeriales: una perspectiva filogenética, morfológica y evolutiva. 2019. *Buceadores de hongos*. 94:1–22. DOI: 10.1007/s13225-018-0416-6.

Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. 2013. In *Studies in Mycology* 76: 51–167.

Poletto, T., Gonzalez, M. C., Muniz, M., Blume, E., Poletto, I., and Brioso, P. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. 2016. *Plant Dis.* 100:1016. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN>

Proplantas S.A. Proplantas (song) – Fall Creek - Seminario de Proplantas el Negocio en el Mundo y la Oportunidad en Colombia 10 y 11 de Septiembre de 2014. Bogotá Colombia. Bogotá, Cundinamarca, Colombia.

Punithalingam E. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. 1980. Cramer, Vaduz.

Rodrigues, T. M. S, Maffia, L. A., Dhingra, O. D., y Mizubuti, E. S. G. In vitro production of conidia of *Alternaria solani*. 2010. *Tropical Plant Pathology*, 35:203-212.

Romero N. Manual para beneficiarios: aclareos y podas. Coordinación general de educación y desarrollo tecnológico. 2009. CONAFOR. México.

Romero, C.A. El arándano en Perú y el mundo; producción, comercio y perspectivas. 2016. Ministerio de Agricultura y Riego del Perú. Lima. 42pp. Disponible en línea en: <http://repositorio.midagri.gob.pe/jspui/bitstream/20.500.13036/44/1/Boletín%20El%20Arándano.pdf>

Rubio, J.C., García, G. Ciordia, M. Situación actual del cultivo del arándano en el mundo. 2010. *Tecnología Agroalimentaria* - n.º 12. Disponible en línea: <http://www.serida.org/pdfs/5566.pdf>

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

Slippers, B. and Wingfield, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and their impact. 2007. *Fungal Biol. Rev.* 21(2-3):90-106. Doi: 10.1016/j.fbr.2007.06.002.

Slippers, B.; Crous, P. W.; Jami F.; Groenewald, J. Z. and Wingfield, M. J. Diversity in the botryosphaeriales: looking back, looking forward. 2017. *Fungal Biol.* 121(4):307-321. Doi: 10.1016/j.funbio.2017.02.002.

SMEAP. Tipos de Poda en Arándano. 2023. Disponible en: Tipos de Poda en Arándano - Artículo - SMEAP México (smeapmexico.org).

Smith N. Flowering plants of the neotropics. 2004. Primera edición. Princenton University. Princenton, New Jersey., USA. 594 p.

Sutton BC. The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, 1980. Hacer vuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Tapia, C., Amaro, J. Género Fusarium. 2014. Revista chilena de infectología, 31(1), 85-86.

Undurraga, P; Vargas, S; Rebolledo, C;. Manual de arándano. 2013. Instituto de investigaciones agropecuarias. Pag 6. Chillan-Chile. Disponible en línea: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39094.pdf>

USHBC. GLOBAL STATE OF THE BLUEBERRY INDUSTRY REPORT. BLUEBERRIES U.S. Highbush Blueberry Council. 2023. ON LINE: <https://ushbc.blueberry.org/>

Valenzuela-Estrada, L. R., Vera-Caraballo, V., Ruth, L.E., Eissenstat, D.M. Root Anatomy, Morphology, and Longevity among Root Orders in *Vaccinium corymbosum* (Ericaceae). 2008. American Journal of Botany 95 (12): 1506-1514.

Wang Y., Zhang Y., Bhojroo V., Rampadarath S., Jeewon R. La filogenética y morfología multigénicas revelan cinco nuevas especies de *Lasiodiplodia* asociadas con los arándanos. 2021. Vida. 11:657. doi: 10.3390/life11070657.

Wharton, P. S. y Diéguez, U. J.. The biology of *Colletotrichum acutatum*. 2004. Anales del Jardín Botánico de Madrid 61 (1), 3-22. doi: 10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 1990. Pages 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J.J., Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA. In: https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_L

ee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics

Wilbur R, Luteyn JL. Flora of Panama. 1978. Part VIII. Family 149. Ericaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden; 65 (1): 27 – 143.

Williamson, J.G., Davies, F.S., Lyrene, P.M. Pruning Blueberry Plants in Florida. 2004. Univ. Florida. EDIS Publ. HS985.

Yu, Ch., Diao, Y., Lu, Q., Zhao, J., Cui, S., Xiong, X., Lu, A., Zhang, X. and Liucorresponding, H. Comparative Genomics Reveals Evolutionary Traits, Mating Strategies, and Pathogenicity-Related Genes Variation of Botryosphaeriaceae. 2022. La genómica comparativa revela rasgos evolutivos, estrategias de apareamiento y la variación genética relacionada con la patogenicidad de Botryosphaeriaceae. Published online 2022 Feb 23. doi: 10.3389/fmicb.2022.800981

Zadoks, J.C. Schein, R.D. Epidemiology and plant disease management. 1979. Oxford University Press. 427 p.

Zhou, Y.; Gong, G.; Cui, Y.; Zhang, D.; Chang, X.; Hu, R.; Liu, N. and Sun, X. Identification of Botryosphaeriaceae species causing kiwifruit rot in Sichuan province, China. 2015. Plant Dis. 99(5):699-708. doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0727-RE.

ANEXO 1. ARTÍCULO PUBLICADO EN REVISTA INDEXADA A CONAHCYT (AGRO PRODUCTIVIDAD).

AGRO PRODUCTIVIDAD



Phytopathogenic fungi associated with blueberry dieback (*Vaccinium corymbosum* L.) pruning and sealing management

González-Molotla Iris A.¹; Valenzuela-Escoboza, Fernando A.^{1*}; López-Valenzuela, Blanca E.¹; Ayala-Armenta, Quintín A.¹; Lizárraga-Sánchez, Glenda J.²

¹ Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Agricultura del Valle del Fuerte. Calle 16 S/N Ave. Japaraqui, Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México. C.P. 81110.

² Universidad Autónoma de Occidente, Departamento de Ciencias Biológicas. Unidad Los Mochis. Boulevard Macario Gaxiola y Carretera Internacional s/n Los Mochis, Sinaloa, México. C.P. 81223.

* Correspondence: fernando.vzla@favf.mx

ABSTRACT

Objective: To identify the phytopathogenic fungi related to blueberry dieback, verify their pathogenicity, incidence after pruning, and the type of sealing.

Design/methodology/approach: For this, symptomatic stem and branch samples were collected in eight commercial blueberry lots at the Ahome, El Fuerte, and Guasave municipalities, state of Sinaloa, from which 196 fungal isolates were obtained. These were morphologically identified to subsequently perform detached leaf and twig pathogenicity tests, on the Biloxi variety; likewise, two pruning angles and three sealants were evaluated and compared to an absolute control in a completely random arrangement.

Results: Based on morphological analysis the *Alternaria*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotia*, and *Curvularia* genera were detected. However, *Lasiodiplodia* isolates were pathogenic in leaves and twigs, while the best result is achieved with the angle 45° pruning sealing with washable plastic-type white vinyl paint plus copper oxychloride.

Limitations on study/implications: None.

Findings/conclusions: The results open new research lines related to molecular identification and disease impact on performance.

Keywords: blueberry, dieback, *Lasiodiplodia*.

Citation: González-Molotla I. A., Valenzuela-Escoboza, F. A., López-Valenzuela, B. E., Ayala-Armenta, Q. A., & Lizárraga-Sánchez, G. J. (2023). Phytopathogenic fungi associated with blueberry dieback (*Vaccinium corymbosum* L.) pruning and sealing management *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v16i11.2723>

Academic Editors: Jorge Cadena Itiguez and Lucero del Mar Ruiz Posadas

Received: June 11, 2023.

Accepted: September 19, 2023.

Published on-line: January 02, 2024.

Agro Productividad, 16(11), November, 2023, pp. 59-64.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license.



INTRODUCTION

Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is a fruit plant, recently grown in at least 30 countries. Peru (261,450 t), Chile (185,300 t), Mexico (85,100 t), United States (328,210 t), South Africa (26,000 t), Poland (55,500 t) and Canada (80,420 t) stand out as suppliers (USDA-FAS, 2021). In Mexico, job creation during its harvesting season is highlighted, since it is a 100% manual labor process with a significant economic impact (Pérez-Cruz, 2018). From planting to harvest, blueberries require technical support, constant care, and different conditions, coupled with intensive agricultural practices. This has induced emerging phytopathogens that impact production. Worldwide, various fungi have been



reported to induce damage in different producing areas, among which *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Microsphaera vaccinii*, *Phomopsis vaccinii*, *Stemphyllium* sp. (Cline and Schilder, 2006), *Bipolaris cynodontis* (Sisterna *et al.*, 2009), *Botrytis cinerea* (Bristow and Milholland, 1995) stand out. One of the most common diseases is the so-called “descending death blueberry dieback”, caused by members of the Botryosphaericeae family, particularly *Lasiodiplodia theobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, and *Neofusicoccum parvum*. These, without exception, colonize all stem tissues, inducing leaf and stem necrosis due to a lack of water and nutrients. The above makes knowing the pathogens present in commercial plantations necessary to establish management strategies, and these phytopathogens’ correct identification and characterization essential. Therefore, this research objectives were a) to identify the fungi related to blueberry dieback through morphological studies; b) *in vitro*, determine the pathogenicity of fungi associated with blueberry dieback; c) to evaluate *in planta* two pruning and sealing techniques used in the region, and their correlation to blueberry dieback incidence.

MATERIALS AND METHODS

Seven commercial orchards of between two and four hectares were sampled at the Guasave, El Fuerte, and Ahome municipalities (state of Sinaloa) from October 2020 to July 2021; sampling in zigzag, 28 symptomatic stems were taken per orchard. The collected samples were transported to a laboratory in humid chambers at 4 °C. Isolation was performed in water-agar (AA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, Mexico) following the procedure by Maraite *et al.* (1997) with a modification. To purify the isolates, hyphal tips were transferred to potato-dextrose-agar (PDA; Bioxon; Cuautitlán Izcalli, State of Mexico, Mexico). The pure culture media were preserved in filter paper, 10% glycerol, and three-times-distilled sterile water (TDSW), for later use.

The morphological characterization was done by taking macroscopic variables such as the colony color, mycelium type, acervuli, pycnidia, sporodochia, ascostromas, free conidiophores, and conidia presence; in addition to their radial growth rate (Granados-Montero, 2018). The pure isolates were placed in Petri dishes with PDA medium and incubated for 12 days at 25 ± 2 °C in a 12 h light by 12 h dark regime, to determine their phenotypic characteristics and assess the mycelial growth rate (French and Hebert, 1980). The microscopic characterization was done with an Olympus Lx compound microscope with a micrometer. The shape of the conidia, the number of cells, coloration, length, width, and ornamentations were also considered. The production of pigments, type of margin, texture, and density were determined by reports in the literature, and the colony color, on the front and back, based on the color scale by Kelly and Judd (1976). The detached leaf pathogenicity occurred in the Biloxi varieties, on the first run, and in the Atlanthis during the second. Well-developed leaves were taken from the middle part of the plants. Inoculum production was done following the methodology by Foolad *et al.* (2000) with some modifications. Pathogenicity tests on detached leaves were carried out following the methodology by Peever *et al.* (2000) with some modifications. The experiment was carried out on two occasions, their treatments were distributed in a completely random arrangement with four repetitions and an absolute control.

Pathogenicity was evaluated seven days later by observing and measuring the affected leaf area (ALA). The pathogenicity tests on twigs were assessed in healthy 12 cm twigs with no leaves and disinfected with a 1.25% sodium hypochlorite solution. For this, 5 mm diameter mycelium discs from the colony's growth margin were placed in the center of pre-punctured twigs, then, incubating four twigs per tray in a humid chamber. The experiment was run twice, under normal light and temperature conditions for nine days, with a random distribution; Affected length area was the evaluated parameter (De la Mora-Castañeda *et al.*, 2014). The *in planta* tests were done on two-year-old Atlanthis variety plants, evaluating two pruning angles, 180° and 45° in a three sealants combination (Berel brand, washable plastic-type white vinyl paint, washable plastic-type white vinyl paint brand Berel plus copper oxychloride at a rate of 100 g per L of paint, and hydrogen peroxide), compared to plants with no sealing, in four repetitions; The experiment ran for 60 days in a random arrangement, under natural conditions of light, humidity, and temperature.

The affected leaf area percentages were statistically analyzed using the Kormogorof-Smirnov normality test and applying the Lilliefors correction, before an ANOVA using the SPSS Statistics 26 software. Given that the experiments were run on two occasions, and these showed an interaction between isolates and experiments, both results are expressed together.

RESULTS AND DISCUSSION

The colony and conidia phenotypic characteristics were determined in PDA after the corresponding incubation period. This allowed the identification of isolates (Figure 1) in the *Alternaria* spp, *Fusarium* spp, *Lasiodiplodia* spp, *Pestalotia* spp., and *Curvularia* spp. genus (Barnett and Hunter, 1972 and Phillips *et al.*, 2013).

From the total obtained isolates, characteristics from several genera were observed in different percentages (Figure 2), *Alternaria* spp. the most frequent.

In the detached leaves, not all the collected isolates were pathogenic. There are significant differences between isolates, $\alpha=0.05$, $F=2.344$, and 95% CI. The most pathogenic

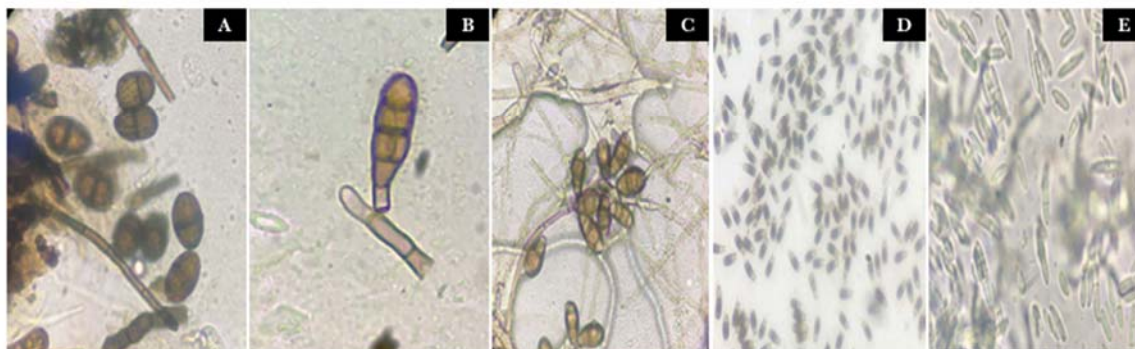


Figure 1. Conidia from PDA culture medium. A) *Lasiodiplodia* spp; B) *Alternaria* spp; C) *Curvularia*; D) *Pestalotia* spp, and E) *Fusarium* spp.

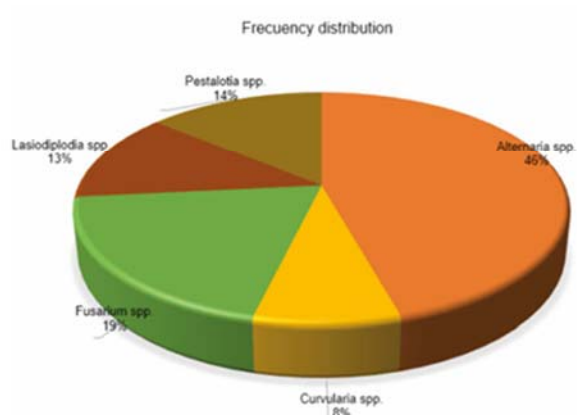


Figure 2. Pathogens percentage by gender.

being *Lasiodiplodia* spp. and *Pestalotia* spp. (Figure 3a) in their tests. Meanwhile, in the pathogenicity tests on vareta, only the isolates corresponding to the genus *Lasiodiplodia* spp. were pathogenic (Figure 3b).

The first in planta symptoms in the tests occurred between days 45 to 60 and appeared from the cutting area. There are significant differences between the tested treatments, vinyl paint plus copper oxychloride treatment the one with the best results.

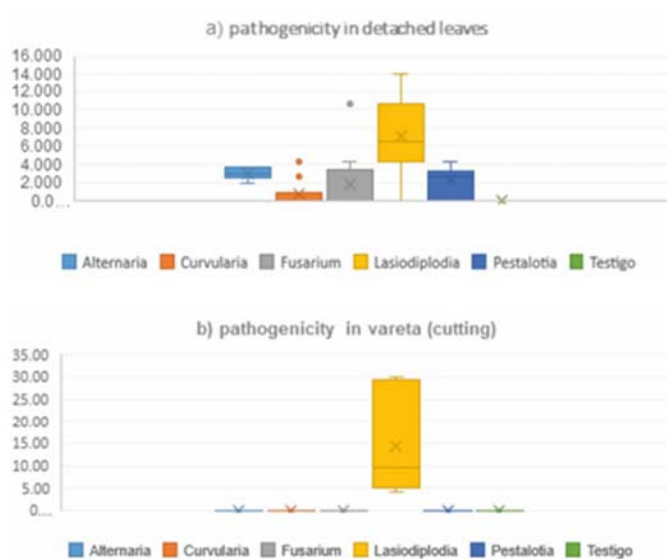


Figure 3. Pathogenicity tests. a) pathogenic isolates in detached leaves; b) pathogenicity in twigs (*Lasiodiplodia* spp.).

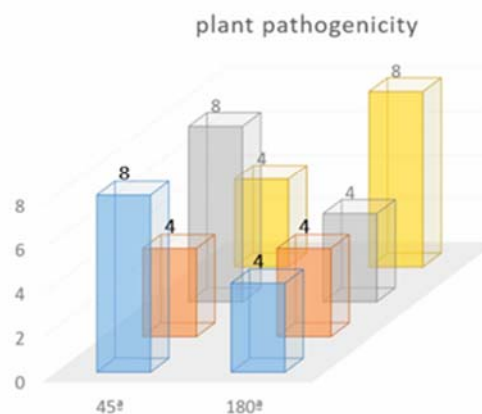


Figure 4. Plants with initial symptoms of blueberry dieback 60 days after pruning: blue bar: vinyl Paint; red bar: vinyl Paint + copper; yellow bar: unsealed

CONCLUSIONS

The pathogens of *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Pestalotia* spp., *Curvularia* spp. and *Botryosphaeria* spp. genera were found associated with blueberry dieback, which occurs due to the different pruning on the crop. The identity of the species was done through morphological characterization. From the total tested isolates, only those from the *Lasiodiplodia* spp. genus correlate with the leaf and rod pathogenicity tests. Likewise, the best treatment to seal, with any pruning angle, is vinyl paint plus copper oxychloride at a 100g/L rate.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the authors for their collaboration and contributions to the development of this work and the Universidad Autónoma de Sinaloa for its support.

REFERENCES

- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. 241p.
- Berbee, M., Pirseyedi, M., and Hubbard, S. 1999. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91(6): 964-977.
- De la Mora-Castañeda, J.G., Gibrián-Tovar, D., Omar A. Pérez-Vera, O.A. 2014. *Neofusicoccum eucalyptorum* (= *Botryosphaeria eucalyptorum*) Y *N. parvum*: PATÓGENOS EN PLANTACIONES DE EUCALIPTO EN MÉXICO. División de Ciencias Forestales (Departamento de Ecología y Silvicultura), Universidad Autónoma Chapingo. 187-197
- Fabrega, A., Agut, M., Calvo, M.A. 2002. El género *Alternaria*: características morfológicas y capacidad de producción de micotoxinas. *Anales de la Real Academia de Doctores* Volumen (6): 357-367.
- French, E.R., Hebert, T. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica. p. 176.
- Granados-Montero, M. 2018. Identificación morfológica de hongos fitopatógenos. Universidad de Costa Rica. 42p.
- Kelly, K.L., Judd, D.E. 1976. Color Universal language and dictionary of names. National Bureau of standards (U.S.). Special publication 440. 184p.
- Kim, Y.K., Xiao, C.K., Rogers, J.D. 2005. Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphaeroopsis pyrripitrescens*. *Mycologia* 97(1): 25-32.

- Maraite, M., Zinno, T.D., Longree, H., Daumerie, V., Duveiller, E. 1997. Fungi associated with foliar blight of wheat in warm areas. *In*: Duveiller E, Duvin HJ, Reeves J, and MacNab A (eds). Helminthosporium blight of wheat: Spot blotch and tan spot. CIMMYT. 293-300p.
- Peever, T.L., Olsen, L., Ibañez, A., Timmer, L. W. 2000. Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria* spp. causing brown spot of grapefruit and tangerine × grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathology* 90:407-414.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *In* *Studies in Mycology* 76: 51–167.
- Simmons, E. G. 2007. *Alternaria: an identification manual*. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
- Tapia, C., Amaro, J. 2014. Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86.
- Zadoks, J.C. Schein, R.D. 1979. *Epidemiology and plant disease management*. Oxford University Press. 427 p.

