

HONGOS ASOCIADOS A PUDRICIÓN DEL PEDÚNCULO Y MUERTE DESCENDENTE DEL MANGO (*Mangifera indica* L.)

FUNGI ASSOCIATED TO STEM-END ROT AND DIEBACK OF MANGO (*Mangifera indica* L.)

Maricarmen Sandoval-Sánchez¹, Daniel Nieto-Ángel^{1*}, J. Sergio Sandoval-Islas¹, Daniel Téliz-Ortiz¹,
Mario Orozco-Santos², H. Victoria Silva-Rojas³

¹Fitosanidad-Fitopatología, ³Genética y Productividad-Producción de Semillas. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (dnieto@colpos.mx). ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Carretera Colima-Manzanillo. Km. 35. 28930. Tecomán, Colima.

RESUMEN

Las pudriciones del pedúnculo de frutos y muerte descendente de ramas de mango (*Mangifera indica* L.) son asociadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Los objetivos de este estudio fueron identificar morfológica y filogenéticamente diferentes cepas de hongos aisladas de frutos con pudrición del pedúnculo y ramas con muerte descendente de los cultivares Ataulfo, Kent y Tommy Atkins, de cinco estados productores de México, y determinar su asociación con ambas enfermedades. Las muestras se recolectaron entre marzo del 2010 y junio del 2011. Los hongos asociados con la pudrición del pedúnculo correspondieron a *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum parvum*, y se detectó también a *Neofusicoccum* sp.; los hongos asociados con la muerte descendente de ramas correspondieron a *L. pseudotheobromae* y *N. parvum*. Se identificó la posible asociación de pudrición del pedúnculo con muerte descendente, ya que los hongos asociados fueron patógenos al inocularlos en los pedúnculos de frutos de Ataulfo, Kent y Tommy Atkins. Este sería el primer estudio que identifica pudrición del pedúnculo o muerte descendente de ramas de mango en México por *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* y *N. parvum*.

Palabras clave: hongos postcosecha, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum* sp., *Mangifera indica*.

INTRODUCCIÓN

La pudrición del pedúnculo de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) causa pérdidas severas después de la cosecha y son más importantes

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2012. Aprobado: noviembre, 2012.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 47: 61-73. 2013.

ABSTRACT

Stem-end rot of fruits and dieback of branches in mango (*Mangifera indica* L.) are associated with fungi of the family Botryosphaeriaceae. The objectives of the present study were to identify morphologically and phylogenetically different strains of fungi isolated from fruits with stem-end rot and branches with dieback of the cultivars Ataulfo, Kent and Tommy Atkins, of five producing states of México, and to determine their association with both diseases. The samples were collected between March of 2010 and June of 2011. The fungi associated with stem-end rot corresponded to *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*, and *Neofusicoccum* sp. was also detected; the fungi associated with dieback of branches corresponded to *L. pseudotheobromae* and *N. parvum*. The possible association of stem-end rot with dieback was identified, given that the associated fungi were pathogenic when inoculated in the stems of fruits of Ataulfo, Kent and Tommy Atkins. This would be the first study that identifies stem-end rot or dieback in branches of mango in Mexico from *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* and *N. parvum*.

Key words: postharvest fungi, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum* sp., *Mangifera indica*.

INTRODUCTION

Stem-end rot of mango fruits (*Mangifera indica* L.) causes severe postharvest losses, which are more important during prolonged storage, because they reduce fruit quality and limit its commercialization (Johnson *et al.*, 1991). The rot is caused by the fungi *Dothiorella dominicana* Petr. & Cif. (Johnson *et al.*, 1991), *Lasiodiplodia theobromae*

durante el almacenamiento prolongado, porque reducen la calidad de los frutos y limitan su comercialización (Johnson *et al.*, 1991). La pudrición es ocasionada por los hongos *Dothiorella dominicana* Petr. & Cif. (Johnson *et al.*, 1991), *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (Johnson *et al.*, 1991; Mirzaee *et al.*, 2002), *Neofusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips (Ni *et al.*, 2010), *N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L. Phillips (Costa *et al.*, 2010), *Phomopsis mangiferae* (Sacc.) Bubák y *Pestalotiopsis mangiferae* (Henn.) Steyaert (Johnson *et al.*, 1991; Ko *et al.*, 2009). Los desórdenes de declinación que comprenden síntomas como tizón, cancrrosis, gomosis y muerte descendente de ramas comparten etiologías similares con las pudriciones del pedúnculo (Khanzada *et al.*, 2004; Javier-Alva *et al.*, 2009). En México no existen reportes que precisen los agentes causales de la pudrición del pedúnculo, ni su asociación con la muerte descendente de ramas que proporcionen información para el manejo de la enfermedad desde la etapa de crecimiento de la planta hasta la época de desarrollo del fruto y cosecha. Los objetivos del presente estudio fueron identificar morfológica y molecularmente los hongos aislados de frutos de mango, de las regiones productoras de la Costa del Pacífico, con síntomas de pudrición del pedúnculo y de muerte descendente en ramas y determinar la asociación de ambas patologías.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de frutos y ramas

De marzo del 2010 a junio del 2011 se recolectaron 110 frutos de los cultivares Aaulfo, Kent y Tommy Atkins con síntomas de pudrición de pedúnculo y muerte descendente en ramas, en huertos de mango en cinco estados productores de la Costa del Pacífico de México. De esos frutos únicamente 58 presentaban síntoma de pudrición de pedúnculo. Las recolectas se hicieron en huertos ubicados en los estados de Colima (Coquimatlán y Tecmán: 16 Tommy Atkins y cuatro Aaulfo), Guerrero (Acapulco de Juárez: siete Tommy Atkins y 13 Aaulfo), Jalisco (Tomatlán: 10 Tommy Atkins) y Nayarit (Jalcocotán: ocho Kent). Además, se seleccionaron 60 ramas con síntomas de muerte descendente en 10 huertos ubicados en Guerrero (Atoyac de Álvarez y San Jerónimo de Juárez: Tommy Atkins; San Luis de la Loma, Tecpan de Galeana y Zacualpan: Aaulfo) y Michoacán (Nueva Italia: Aaulfo).

(Pat.) Griff. & Maubl. (Johnson *et al.*, 1991; Mirzaee *et al.*, 2002), *Neofusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J. L. Phillips (Ni *et al.*, 2010), *N. parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips (Costa *et al.*, 2010), *Phomopsis mangiferae* (Sacc.) Bubák and *Pestalotiopsis mangiferae* (Henn.) Steyaert (Johnson *et al.*, 1991; Ko *et al.*, 2009). The disorders of decline that include symptoms such as blight, canker, gummosis and dieback of branches share similar etiologies with the stem-end rots (Khanzada *et al.*, 2004; Javier-Alva *et al.*, 2009). In Mexico there are no reports that identify the causal agents of stem-end rot, nor its association with dieback of branches that provide information for the management of the disease from the growth stage of the plant to the period of fruit development and harvest. The objectives of the present study were to identify morphologically and molecularly the fungi isolated from mango fruits, of the productive regions of the Pacific Coast, with symptoms of stem-end rot and dieback in branches and to determine the association of the two pathologies.

MATERIALS AND METHODS

Collection of fruits and branches

From March of 2010 to June of 2011, 110 fruits were collected of the cultivars Aaulfo, Kent and Tommy Atkins with symptoms of stem-end rot and dieback in branches, in mango plantations in five productive states of the Pacific Coast of Mexico. Of these fruits, 58 presented symptoms of stem-end rot. The collections were made in plantations located in the states of Colima (Coquimatlán and Tecmán: 16 Tommy Atkins and four Aaulfo) Guerrero (Acapulco de Juárez: seven Tommy Atkins and 13 Aaulfo), Jalisco (Tomatlán: 10 Tommy Atkins) and Nayarit (Jalcocotán: eight Kent). In addition, 60 branches with symptoms of dieback were selected in 10 plantations located in Guerrero (Atoyac de Álvarez and San Jerónimo de Juárez: Tommy Atkins; San Luis de la Loma, Tecpan de Galeana and Zacualpan: Aaulfo) and Michoacán (Nueva Italia: Aaulfo).

Isolates

Segments of approximately 125 mm³ were obtained from the zone of advancement of stem-end rot in fruits and of necrosis in branches. The tissues of fruits and branches were disinfested by immersion in sodium hypochlorite at 2 % during 3 min and

Aislamientos

Se obtuvieron segmentos de aproximadamente 125 mm³ de la zona de avance de la pudrición en frutos y de la necrosis en ramas. Los tejidos de frutos y ramas se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 min y al 3 % durante 4 min. Se lavaron con agua destilada esterilizada, se secaron con papel filtro esterilizado y se colocaron cuatro trozos por caja petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Las cajas se incubaron bajo luz negra continua y a 25 ± 1 °C durante el día. Se realizaron cultivos monospóricos y se transfirieron a cajas petri nuevas con PDA.

Pruebas de patogenicidad y de asociación entre hongos aislados de frutos y ramas

Se inocularon pedúnculos de frutos de mango con los hongos aislados de la pudrición de frutos y de la muerte de ramas para tener evidencia de la etiología de la pudrición del pedúnculo, caracterizar las pudriciones y establecer su posible relación con la muerte descendente. Tres aislados de frutos y cuatro de ramas se seleccionaron, según su prevalencia, localidad, cultivar y procedencia. Se usaron frutos sanos en madurez fisiológica, con tamaño uniforme y sin daños físicos de los tres cultivares, se lavaron con agua jabonosa, se desinfectaron durante 3 min por inmersión en hipoclorito de sodio al 2 % y se enjuagaron con agua destilada esterilizada. Se inocularon cinco frutos por cultivar y se evaluó el porcentaje de frutos que produjeron síntomas con cada uno de los siete aislamientos, para lo cual se observaron diariamente registrando sólo los síntomas y signos externos. Hubo dos tratamientos: 1) bajo condiciones asepticas se realizó una herida de aproximadamente 5 mm de profundidad sobre el pedúnculo de cada fruto, mediante punción con un palillo de madera esterilizado; sobre cada herida se colocó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con crecimiento micelial de seis días de edad y se sostuvo con una cinta Parafilm®; hubo frutos testigo con herida y disco de PDA sin inóculo; 2) se realizó el mismo procedimiento, pero sin herida, los frutos se colocaron en charolas de unicel con toallas estériles de papel, humedecidas con agua destilada esterilizada, dentro de bolsas plásticas, a 24 ± 2 °C; los hongos se reisolaron en cultivos puros a partir de los frutos inoculados en cada tratamiento y sus colonias y estructuras reproductivas se compararon con las de los aislamientos inoculados originalmente.

Caracterización morfológica

Se registró el crecimiento micelial, pigmentación y formación de estructuras reproductivas de 10 colonias por aislamiento de los hongos sembrados en cajas petri. Las colonias fueron

at 3 % during 4 min. They were washed with sterilized distilled water, dried with sterilized filter paper and four pieces per petri dish were placed with Potato-Dextrose-Agar (PDA) medium. The dishes were incubated under continuous black light and at 25 ± 1 °C during the day. Monosporic cultures were made and were transferred to new petri dishes with PDA.

Tests of pathogenicity and of association between fungi isolated from fruits and branches

Stem ends of mango fruits were inoculated with the fungi isolated from the fruit rot and dieback of branches to obtain evidence of the etiology of the stem-end rot, to characterize the rots and to establish their possible relationship with dieback. Three isolates were selected of fruits and four of branches, according to their prevalence, locality, cultivar and precedence. Healthy fruits in physiological maturity were used, with uniform size and without physical damage from the three cultivars. They were rinsed with soapy water, were disinfested by immersion in sodium hypochlorite at 2 % during 3 min and were rinsed with sterilized distilled water. Five fruits per cultivar were inoculated and an evaluation was made of the percentage of fruits that produced symptoms with each one of the seven isolates, for which daily observations were made, registering only the symptoms and external signs. There were two treatments: 1) under aseptic conditions a lesion of approximately 5 mm of depth was made on the stem end of each fruit, by puncture with a sterilized toothpick; a disc of PDA was placed over each lesion of 5 mm diameter with mycelial growth of six days of age, and was fastened with Parafilm® tape; there were control fruits with a lesion, with a PDA disc without inoculum; 2) the same procedure was made, but without a lesion, the fruits were placed in styrofoam trays with sterile paper towels, moistened with sterilized distilled water, in plastic bags, at 24 ± 2 °C; the fungi were re-isolated in pure cultures from the inoculated fruits in both treatments, and their colonies and reproductive structures were compared with those of the isolates that were originally inoculated.

Morphological characterization

Mycelial growth, pigmentation and formation of reproductive structures were registered of 10 colonies per isolate of the fungi sown in petri dishes. The colonies were incubated under continuous black light at 25 ± 1 °C during the day. The isolates were identified morphologically based on the color, form of the colony, growth of the mycelia, sporulation, form of conidia and dimensions. The keys and taxonomic descriptions of Sutton (1980) and Barnett and Hunter (1998) were used for

incubadas bajo luz negra continua a 25 ± 1 °C durante el día. Los aislamientos se identificaron morfológicamente con base en el color, forma de la colonia, crecimiento del micelio, esporulación, forma de conidios y dimensiones. Se usaron las claves y descripciones taxonómicas de Sutton (1980) y Barnett y Hunter (1998) para géneros, de Punithalingam (1976), Burgess *et al.* (2006) y Alves *et al.* (2008) para especies de *Lasiodiplodia* y de Pennycook y Samuels (1985) y Crous *et al.* (2006) para especies de *Neofusicoccum*. Las cepas identificadas se conservaron en tubos de ensayo con aceite mineral esterilizado para estudios posteriores.

Identificación molecular y análisis filogenético

El ADN se extrajo de cultivos monoconidiales crecidos en medio PDA, con la metodología descrita por Ahrens y Seemüller (1992). La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % (Ultrapure, Gibco, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). La concentración de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro Lambda BIO 10 (Perkin Elmer®), diluciones con 20 ng se usaron para la amplificación de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2, y el gen 5.8S ribosomal, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la combinación de los iniciadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG).

El producto amplificado se purificó con el kit Wizard (Promega®, USA) y se secuenció con el Genetic Analyzer modelo 3730XL® (Applied Biosystem®, USA). Las secuencias consenso se ensamblaron, editaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999) y depositaron en el GenBank (NCBI, 2012). Para los análisis evolutivos, todas las secuencias consenso fueron alineadas con el ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el Software MEGA 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007). Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron para los conjuntos de datos de la región ITS1-5.8S-ITS2 con el método de máxima parsimonia. Este análisis se efectuó mediante el Close Neighbour Interchange (CNI), opción de búsqueda (nivel=1) con el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones), y los espacios o datos faltantes fueron considerados deleciones completas. Para conocer los valores de confianza para los clados del árbol, se realizó un análisis bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Las secuencias de *L. pseudotheobromae* (no. de acceso EU101311, Namibia), *L. theobromae* (no. de acceso FJ150695, USA), *N. parvum* (no. de acceso EU080926, Uruguay), *Neofusicoccum* sp. (no. de acceso FJ900608, Camerún) y *P. theae* (no. de acceso HQ832793, China), depositadas en la base de datos del GenBank, fueron

genus, those of Punithalingam (1976), Burgess *et al.* (2006) and Alves *et al.* (2008) for species of *Lasiodiplodia* and of Pennycook and Samuels (1985) and Crous *et al.* (2006) for species of *Neofusicoccum*. The identified strains were conserved in test tubes with sterilized mineral oil for later studies.

Molecular identification and phylogenetic analysis

The DNA was extracted from monoconidial cultures, grown in PDA medium, with the methodology described by Ahrens and Seemüller (1992). The quality of the DNA was verified by means of horizontal electrophoresis in agarose gel at 1 % (Ultrapure, Gibco, USA) and the bands were visualized in a transiluminator (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). The concentration of DNA was quantified with a Lambda BIO 10 spectrophotometer (Perkin Elmer®), dilutions with 20 ng were used for the amplification of the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2, in the 5.8S ribosomal gene, through the chain reaction of the polymerase (PCR) and the combination of the universal primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) and ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG).

The amplified product was purified with the Wizard kit (Promega®, USA) and was sequenced with the Genetic Analyzer model 3730XL® (Applied Biosystem®, USA). The consensus sequences were assembled, edited with the option CAP (Contig Assembly Program) of the Software BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999) and deposited in the GenBank (NCBI, 2012). For the evolutionary analyses, all of the consensus sequences were aligned with the ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 2007). The phylogenetic reconstructions were made for the sets of data of the region ITS1-5.8S-ITS2 with the method of maximum parsimony. This analysis was made using the Close Neighbor Interchange (CNI), search option (level=1) with the initial tree by random addition (10 replicates), and the spaces or missing data were considered complete deletions. To know the confidence values for the clades of the tree, a bootstrap analysis was made with 1000 repetitions (Felsenstein, 1985). The sequences of *L. pseudotheobromae* (access number EU101311, Namibia), *L. theobromae* (access number FJ150695, USA), *N. parvum* (access number EU080926, Uruguay), *Neofusicoccum* sp. (access number FJ900608, Cameroon) and *P. theae* (access number HQ832793, China), deposited in the data base of the GenBank, were selected to be included as reference species along with those obtained in the present study. *Phaeomoniella capensis* (access number FJ372391) was designated as the species outside the group for the construction of the evolutionary tree.

seleccionadas para incluirlas como especies de referencia junto con las obtenidas en este estudio. *Phaeomoniella capensis* (no. de acceso FJ372391) se designó como la especie fuera de grupo para la construcción del árbol evolutivo.

RESULTADOS

Descripción de síntomas de frutos y ramas recolectados

La pudrición en frutos, color café claro a oscuro, se originó alrededor del pedúnculo y se extendió a lo largo de él con márgenes ondulados. En los árboles muestreados se observaron ramas con secamiento descendente que iniciaba en el ápice y avanzaba hacia la base de la rama, contrastaban con ramas de aspecto normal, y mostraban haces vasculares necrosados y exudados gomosos rojizos. En un estado avanzado de muerte descendente, los árboles exhibían secamiento con defoliación parcial y ramas con hojas secas y verdes.

Frecuencias de aislamientos

De los frutos recolectados se aislaron *Colletotrichum* sp., *L. theobromae*, *N. parvum*, *Neofusicoccum* sp. y *Pestalotiopsis* sp. y de las ramas *L. pseudotheobromae*, *N. parvum*, *Pestalotiopsis* sp., *P. theae* y *Phomopsis* sp. (Cuadro 1).

Pruebas de asociación entre hongos aislados de frutos y ramas

Los siete aislamientos utilizados en las pruebas de asociación se nombraron según el hospedante (fruto o rama), especie de hongo y lugar de procedencia: FLaGr (Fruto *Lasiodiplodia* Guerrero), RLaGr (Rama *Lasiodiplodia* Guerrero), RLaMi (Rama *Lasiodiplodia* Michoacán), FNeJa (Fruto, *Neofusicoccum* Jalisco), FNeNa (Fruto *Neofusicoccum* Nayarit), RNeMi (Rama, *Neofusicoccum* Michoacán) y RPeMi (Rama *Pestalotiopsis* Michoacán). En todos los frutos del cultivar Aaulfo inoculados con los aislamientos de *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* del tratamiento con herida, se observaron síntomas iniciales de pudrición del pedúnculo 7 d después de la inoculación (ddi). Los síntomas con ambos hongos fueron similares y consistieron de manchas negras, con crecimiento de micelio, alrededor de la base del pedúnculo. Luego de 10 ddi se observaron lesiones difusas, hundidas y

RESULTS

Description of symptoms of collected fruits and branches

The rot in fruits, light to dark brown in color, started around the peduncle and extended along it with undulated margins. In the sampled trees, branches with dieback were observed which started at the apex and advanced toward the base of the branch, contrasted with branches of normal aspect, and presented necrotic vascular bundles and reddish gummy exudates. In an advanced stage of dieback, the trees exhibited drying with partial defoliation and branches with dry and green leaves.

Frequencies of isolates

Of the fruits collected *Colletotrichum* sp., *L. theobromae*, *N. parvum*, *Neofusicoccum* sp. and *Pestalotiopsis* sp. were isolated, and from the branches, *L. pseudotheobromae*, *N. parvum*, *Pestalotiopsis* sp., *P. theae* and *Phomopsis* sp. were isolated (Table 1).

Tests of association between fungi isolated from fruits and branches

The seven isolations used in the association tests were named according to the host (fruit or branch), species of fungus and place of origin: FLaGr (Fruit *Lasiodiplodia* Guerrero), RLaGr (Branch *Lasiodiplodia* Guerrero), RLaMi (Branch *Lasiodiplodia* Michoacán), FNeJa (Fruit, *Neofusicoccum* Jalisco), FNeNa (Fruit *Neofusicoccum* Nayarit), RNeMi (Branch, *Neofusicoccum* Michoacán) and RPeMi (Branch *Pestalotiopsis* Michoacán). In all of the fruits of the Aaulfo cultivar inoculated with the isolates of *Lasiodiplodia* and *Neofusicoccum* of the treatment with lesion, initial symptoms of stem end rot were observed 7 d after inoculation (dai). The symptoms with both fungi were similar and consisted of black spots, with mycelia growth, around the base of the stem end. After 10 dai diffuse, sunken and wet lesions were observed in the form of radial projections, which darkened rapidly, coalesced and presented undulated black margins; and 14 dai the dark spots had extended along the concave or convex curvature of the fruit. Mycelia were also observed on the epidermis or emerging through its ruptures,

Cuadro 1. Incidencia de hongos aislados de frutos y ramas de mango con síntomas de pudrición de pedúnculo y muerte descendente de diferentes cultivares de algunos estados de México.**Table 1. Incidence of fungi isolated from fruits and branches of mango with symptoms of stem-end rot and dieback of different cultivars of some states of México.**

Estado	Cultivar	Hongos	Colonias (Núm.)	Incidencia (%)
		Frutos		
Colima [‡]	Ataulfo	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	32	100
Colima [‡]	Tommy Atkins	<i>L. theobromae</i>	123	96
		<i>Colletotrichum</i> sp.	5	4
Guerrero [†]	Ataulfo	<i>L. theobromae</i>	87	84
		<i>Colletotrichum</i> sp.	12	11
		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	5	5
Guerrero [†]	Tommy Atkins	<i>L. theobromae</i>	48	86
		<i>Colletotrichum</i> sp.	5	9
		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	3	5
Jalisco ^b	Tommy Atkins	<i>Neofusicoccum parvum</i>	80	100
Nayarit [§]	Kent	<i>N. parvum</i>	58	91
		<i>Neofusicoccum</i> sp.	6	9
		Ramas		
Michoacán [°]	Tommy Atkins	<i>N. parvum</i>	50	62
		<i>Pestalotiopsis thea</i>	17	21
		<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	13	17
Guerrero				
Zacualpan	Ataulfo	<i>L. pseudotheobromae</i>	63	79
		<i>Phomopsis</i> sp.	17	21
San Jerónimo de Juárez	Tommy Atkins	<i>L. pseudotheobromae</i>	56	70
		<i>Phomopsis</i> sp.	24	30
Tecpan de Galeana	Ataulfo	<i>L. pseudotheobromae</i>	57	71
		<i>Phomopsis</i> sp.	15	19
		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	8	10
Atoyac de Álvarez	Tommy Atkins	<i>L. pseudotheobromae</i>	62	77
		<i>Phomopsis</i> sp.	18	23
San Luis de la Loma	Ataulfo	<i>L. pseudotheobromae</i>	74	92
		<i>Phomopsis</i> sp.	6	8

[‡] Coquimatlán y Tecomán, [†] Acapulco de Juárez, ^b Tomatlán, [§] Jalcocotán, [°] Nueva Italia.

húmedas, originadas en el pedúnculo, con forma de proyecciones radiales, las cuales oscurecieron rápidamente, coalescieron y presentaron márgenes negros ondulados; y 14 ddi las manchas oscuras se habían extendido a lo largo de la curvatura cóncava o convexa del fruto. También se observó micelio sobre la epidermis o emergente a través de rupturas de ella y un exudado acuoso, café que salía de las lenticelas o del pedúnculo. La pudrición total de los frutos ocurrió 20 ddi. El aislamiento RPeMi 20 ddi, sólo ocasionó una mancha negra limitada alrededor del pedúnculo y desarrolló crecimiento de micelio. En el tratamiento sin herida se registraron los mismos

along with a brown colored aqueous exudate which came out of the lenticels or the peduncle. Total rot of the fruits occurred 20 dai. The isolate RPeMi, 20 dai, only caused a limited black spot around the peduncle and developed mycelia growth. In the treatment without lesions the same symptoms were observed, although they were visible 9 dai. In all of the fruits of the cultivars Kent and Tommy Atkins inoculated, the same symptoms were registered with the isolates of *Lasiodiplodia* and *Neofusicoccum*; 5 dai radial, elongated thin dark spots were observed in the peduncle, which coalesced 7 dai turning yellow, sunken and wet and forming black undulated

síntomas, aunque fueron visibles 9 ddi. En todos los frutos de los cultivares Kent y Tommy Atkins inoculados, se registraron los mismos síntomas con los aislamientos de *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*; 5 ddi se apreciaron manchas radiales, alargadas, delgadas y oscuras originadas en el pedúnculo, que coalescieron 7 ddi tornándose amarillentas, hundidas y húmedas y formando márgenes negros ondulados. La pudrición total de los frutos ocurrió 10 ddi. No se observaron síntomas con RPeMi. Los frutos testigo no desarrollaron síntomas (Figura 1 A-F).

Caracterización morfológica

Las colonias de *Lasiodiplodia* spp. desarrollaron inicialmente (1 a 3 d) micelio algodónoso color

margins. The total rot of the fruit occurred 10 dai. No symptoms were observed with RPeMi. The control fruits did not develop symptoms (Figure 1 A-F).

Morphological characterization

The colonies of *Lasiodiplodia* spp. initially developed (1 to 3 d) cottony grayish-white mycelia, with rapid and abundant aerial growth. Afterwards, the color changed to olive-gray, dense in the center of the dish with dark gray. At 15 d picnidial conidiomas appeared produced in stroma, semi-immersed, dispersed, simple or compound and in clusters; black, pyriform and ostiolate pycnidia; also, hyaline, cylindrical, simple, septate or aseptate conidiophores appeared, which emerged from the inner wall of the

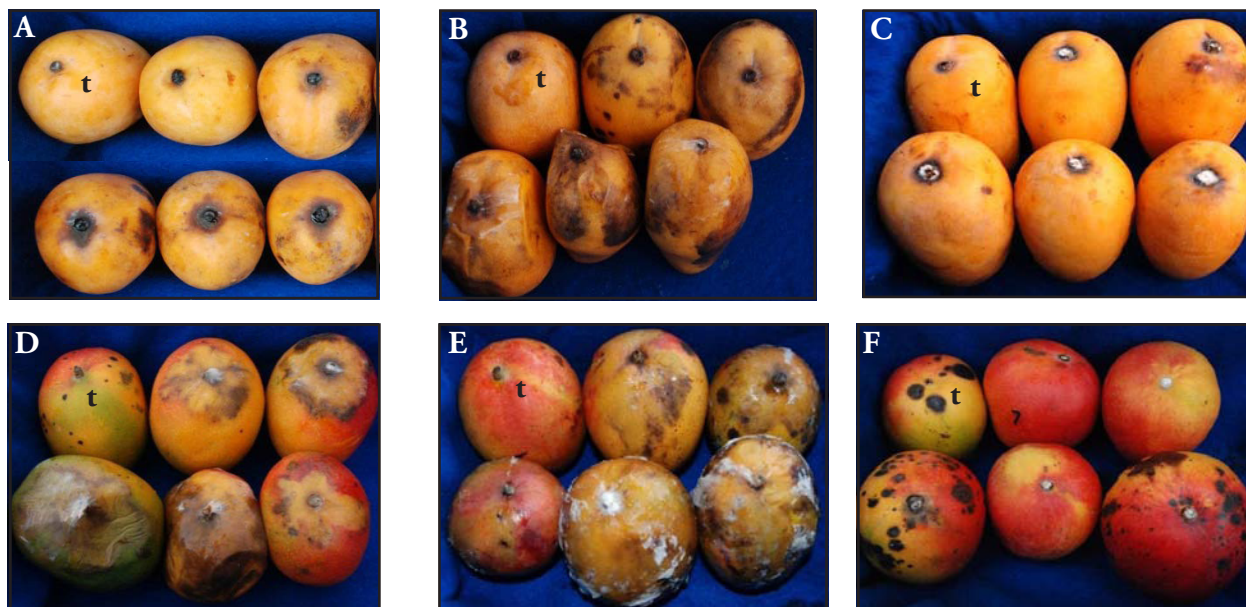


Figura 1. Síntomas de pudrición del pedúnculo en frutos de mango cv. Ataulfo (A-C) y Tommy Atkins (D-F), causados por aislamientos de *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum* y *Pestalotiopsis theae*, y testigos (t). A) Manchas negras limitadas alrededor de la base del pedúnculo, aislamiento FNeNa (*N. parvum*), 7 d después de la inoculación (ddi). B) Lesiones difusas, hundidas y húmedas con márgenes negros ondulados, FNeNa, 10 ddi. C) Manchas negras limitadas alrededor del pedúnculo, con crecimiento de micelio sobre éste, aislamiento RPeMi (*P. theae*), 20 ddi. D) Lesiones amarillentas, hundidas y húmedas con márgenes negros ondulados, aislamiento FLaGr (*L. theobromae*), 7 ddi. E) Pudrición total de frutos con crecimiento de micelio, FLaGr, 10 ddi. F) Frutos sin presencia externa de síntomas, aislamiento RPeMi, 10 ddi.

Figure 1. Symptoms of stem-end rot in mango fruits cv. Ataulfo (A-C) and Tommy Atkins (D-F), caused by isolates of *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *Pestalotiopsis theae*, and controls (t). A) Limited black spots around the peduncle, isolate FNeNa (*N. parvum*), 7 d after inoculation (dai). B) Diffuse, sunken and wet lesions, with black wavy margins, FNeNa, 10 dai. C) Limited black spots around the peduncle, with mycelial growth on it, isolate RPeMi (*P. theae*), 20 dai. D) Yellowish, sunken and wet lesions with black wavy margins, isolate FLaGr (*L. theobromae*), 7 dai. E) Total rot of fruits with mycelial growth, FLaGr, 10 dai. F) Fruits without external presence of symptoms, isolate RPeMi, 10 dai.

blanco-grisáceo, con crecimiento aéreo, rápido y abundante; posteriormente, cambió a gris oliváceo, denso en el centro de la caja con color gris oscuro. Desde los 15 d se apreciaron conidiomas picnidiales producidos en estroma, semi-inmersos, dispersos, simples o compuestos y en agregados; picnidios negros, piriformes y ostiolados; también, conidióforos hialinos, cilíndricos, simples, septados o aseptados, que nacían de la pared interior de células que recubrían la cavidad picnidial y paráfisis hialinos, cilíndricos y aseptados. *Lasiodiplodia theobromae* mostró conidios inmaduros sin septos (amerosporas) hialinos, subovoides a elipsoidales, con pared gruesa y citoplasma granulado, de 20 a 31.02×11.36 a $16.36 \mu\text{m}$ ($25.53 \times 13.16 \mu\text{m}$, promedio de 100 conidios). Los conidios maduros presentaron un septo (didimosporas) de color café oscuro, elipsoidales a ovoides, con estriaciones longitudinales irregulares de 19.44 a 28.86×11.25 a $15.91 \mu\text{m}$ ($24.32 \times 12.27 \mu\text{m}$, promedio de 100 conidios).

En contraste con *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* produjo conidios más grandes y elipsoidales, con el ápice y base redondeados, más amplios en el centro y maduros midieron 23.82 a 31.57×13.89 a $17.44 \mu\text{m}$ ($26.17 \times 16.23 \mu\text{m}$, promedio de 100 conidios). Las colonias de *N. parvum* desarrollaron micelio algodonoso, blanco-grisáceo y abundante al inicio (1 a 3 d) y se tornó gris oscuro después, más denso en el centro de la caja. La formación de conidiomas picnidiales se observó desde los 13 d: uni o multiloculares, individuales o constituidos en estroma, picnidios globosos, piriformes con una papila corta y aguda, y ostiolados; además: conidióforos reducidos a células conidiogénicas, hialinas, holoblásticas, que formaron conidios en sus extremos y surgían de la pared interior del lóculo y recubriéndolo; también, conidios fusiformes a elipsoidales con ápice subobtusos y base truncada, lisos o gutulados, de paredes delgadas, hialinos y unicelulares, que midieron 21.77 a 26.99×5.18 a $8.55 \mu\text{m}$ ($24.92 \times 7.09 \mu\text{m}$, promedio de 150 conidios), y microconidios hialinos, lisos, en forma de barra y truncados en los extremos (Figura 2 A-H).

Análisis filogenético con la secuencia ribosomal

Con las amplificaciones, con los primers ITS5 e ITS4, se obtuvieron fragmentos de 500, 540 y 570 pares de bases (bp) aproximadamente. Los resultados del BLASTN confirmaron que los aislamientos FNeJa,

cells that covered the picnidial cavity and hyaline, cylindrical and aseptate paraphyses. *Lasiodiplodia theobromae* presented immature conidia without septa (amerospores) that were hyaline, sub-ovoid to ellipsoidal, with thick wall and granulated cytoplasm, from 20 to 31.02×11.36 to $16.36 \mu\text{m}$ ($25.53 \times 13.16 \mu\text{m}$, average of 100 conidia). The mature conidia presented dark brown septa (didimosporas) that were dark brown, ellipsoidal to ovoid, with irregular longitudinal striations of 19.44 to 28.86×11.25 to $15.91 \mu\text{m}$ ($24.32 \times 12.27 \mu\text{m}$, average of 100 conidia).

In contrast with *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* produced larger and ellipsoidal conidia, with rounded apex and base, wider in the center and mature measured 23.82 to 31.57×13.89 to $17.44 \mu\text{m}$ ($26.17 \times 16.23 \mu\text{m}$, average of 100 conidia). The colonies of *N. parvum* developed cottony, grayish-white mycelia that were abundant at the beginning (1 to 3 d) and later turned dark gray, denser in the center of the dish. The formation of picnidial conidiomas was observed after 13 d: uni or multiocular, individual or constituted in stroma, globular, pyriform pycnidia with a short and acute papilla, and ostiolate; in addition, conidiophores that were reduced to conidiogenic, hyaline, holoblastic cells, that formed conidia on the ends and came out of the inner wall of the locule and covered it; also, fusiform to ellipsoidal conidia with subobtusos apex and truncated base, smooth or granulated, with thin, hyaline and unicellular walls, which measured 21.77 to 26.99×5.18 to $8.55 \mu\text{m}$ ($24.92 \times 7.09 \mu\text{m}$, average of 100 conidia), and hyaline, smooth microconidia, bar shaped and truncated at the ends (Figure 2 A-H).

Phylogenetic analysis with the ribosomal sequence

With the amplifications, with the primers ITS5 and ITS4, fragments were obtained of 500, 540 and 570 pairs (bp) approximately. The results of BLASTN confirmed that the isolates FNeJa, FNeNa and RNeMi corresponded to *N. parvum*, the isolate FLaGr to *L. theobromae* (access numbers BenBank JQ619648, JQ619649, JQ619650, JQ619651) and the region ITS revealed identities of nucleotides of the sequences of 100 %. Also, the isolates RLaGr and RLaMi were 100 % similar to *L. pseudotheobromae*, and the isolate RPeMi 99 %

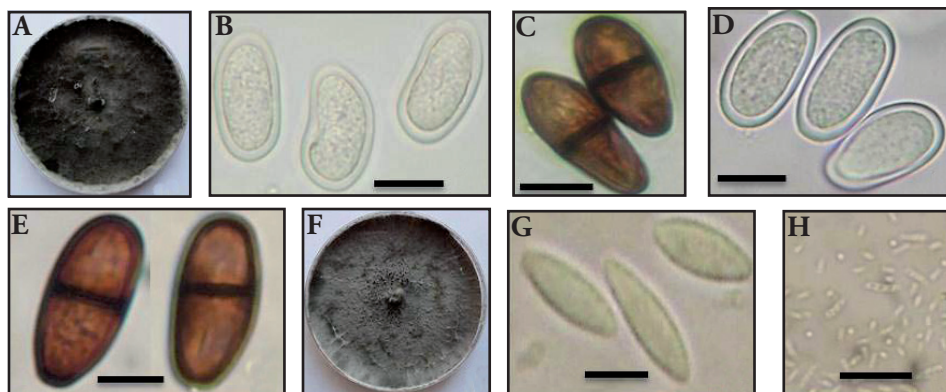


Figura 2. Cultivos y estructuras de reproducción asexual de *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum* producidos en medio PDA. A) Cultivo de 20 d con formación de picnidios, B) Amerosporas y C) Didimosporas de *L. theobromae*. D) Amerosporas y E) Didimosporas de *L. pseudotheobromae*. F) Cultivo de 15 d con formación de picnidios, G) Conidios y H) Microconidios de *N. parvum*. Barras= 10 µm.

Figure 2. Cultures and structures of asexual reproduction of *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* and *Neofusicoccum parvum* produced in PDA medium. A) Culture of 20 d with formation of pycnidia, B) Amerospores and C) Didimospores of *L. theobromae*. D) Amerospores and E) Didimospores of *L. pseudotheobromae*. F) Culture of 15 d with formation of pycnidia, G) Conidia and H) Microconidia of *N. parvum*. Bars = 10 µm.

FNeNa y RNeMi correspondieron a *N. parvum*, el aislamiento FLaGr a *L. theobromae* (números de acceso GenBank JQ619648, JQ619649, JQ619650, JQ619651) y la región ITS reveló identidades de nucleótidos de las secuencias de 100 %. También, los aislamientos RLaGr y RLaMi se asemejaron 100 % a *L. pseudotheobromae*, y el aislamiento RPeMi 99 % a *Pestalotiopsis theae* (números de acceso JQ619644, JQ619645, JQ619652). Las secuencias de los otros dos aislamientos no evaluados en las pruebas de patogenicidad, presentaron 99 % de identidad de sus nucleótidos con *Neofusicoccum* sp. (JQ619646, JQ619647). Los aislamientos evaluados se separaron en cinco clados con el método de máxima parsimonia y fueron denominados *Lp* para *L. pseudotheobromae*, *Lt* para *L. theobromae*, *Np* para *N. parvum*, *Nsp* para *Neofusicoccum* sp. y *Pt* para *P. theae* (Figura 3).

DISCUSIÓN

La pudrición del pedúnculo se reporta como una enfermedad de la postcosecha en las regiones productoras de mango alrededor del mundo, y su etiología es imprecisa (Slippers *et al.*, 2005). En esta investigación, las poblaciones de patógenos de los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán y Nayarit fueron identificadas para decidir los hongos involucrados en los síntomas de pudrición del pedúnculo en

to *Pestalotiopsis theae* (access numbers JQ619644, JQ619645, JQ619652). The sequences of the other two isolates, which were not evaluated in the pathogenicity tests, presented 99 % of identity of their nucleotides with *Neofusicoccum* sp. (JQ619646, JQ619647). The evaluated isolates were separated in five clades with the maximum parsimony method and were denominated *Lp* for *L. pseudotheobromae*, *Lt* for *L. theobromae*, *Np* for *N. parvum*, *Nsp* for *Neofusicoccum* sp. and *Pt* for *P. theae* (Figure 3).

DISCUSSION

Stem-end rot is reported as a postharvest disease in the mango producing regions around the world, and its etiology is imprecise (Slippers *et al.*, 2005). In this investigation, the populations of pathogens of the states of Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán and Nayarit were identified to declare the fungi involved in the symptoms of stem-end rot in mango fruits and recognize the possible association of dieback with stem-end rot. This study is the first exploration of species of the family Botryosphaeriaceae where stem-end rot is associated with dieback of mango in México.

The species *L. theobromae*, *N. mangiferum* and *N. parvum* of the family Botryosphaeriaceae are the ones commonly associated with diseases in the mango

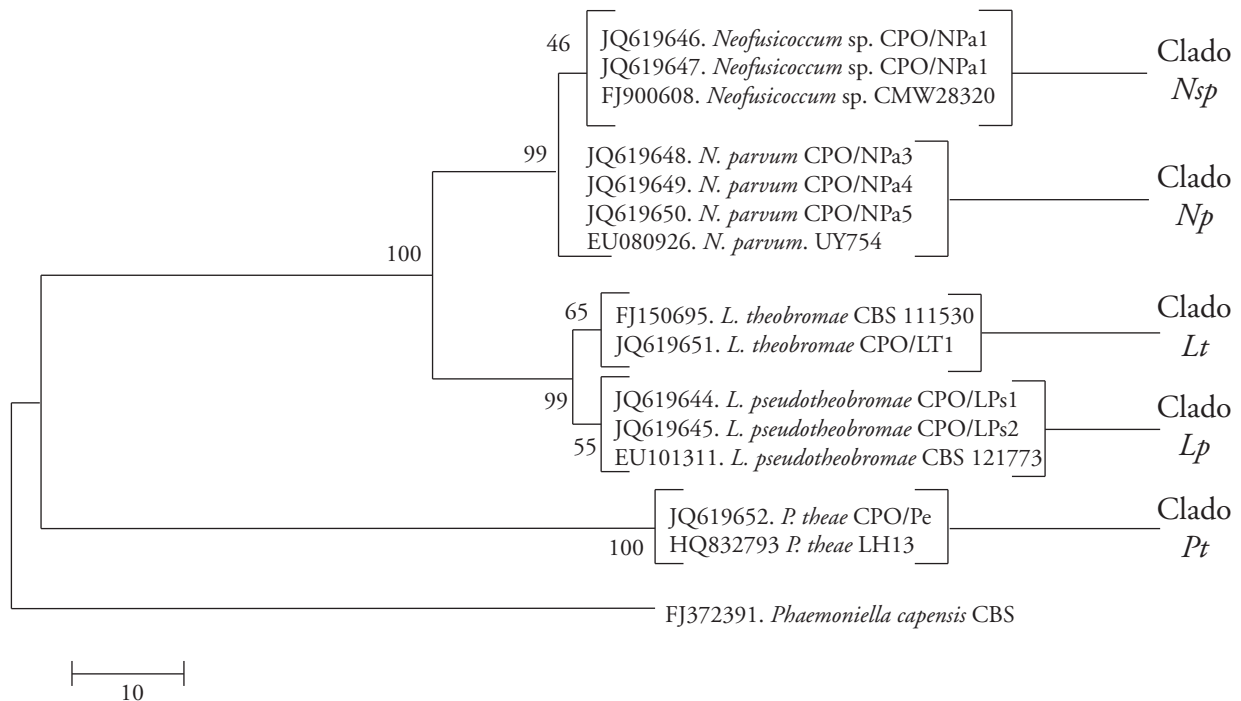


Figura 3. Árbol consenso construido con las secuencias obtenidas de la región del ITS ribosomal de aislamientos de frutos con pudrición del pedúnculo y muerte descendente de ramas de mango procedentes de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán y Nayarit, México, con el método de máxima parsimonia y análisis bootstrap con 1000 repeticiones.

Figure 3. Consensus tree constructed with the sequences obtained from the region of ribosomal ITS of isolates of fruits with stem-end rot and dieback of branches of mango from Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán and Nayarit, México, with the maximum parsimony method and bootstrap analysis with 1000 replicates.

frutos de mango y reconocer la posible asociación de la muerte descendente con la pudrición del pedúnculo. El estudio es la primera exploración de especies de la familia Botryosphaeriaceae donde la pudrición del pedúnculo es asociada con la muerte descendente de mango en México.

Las especies *L. theobromae*, *N. mangiferum* y *N. parvum* de la familia Botryosphaeriaceae se asocian comúnmente con enfermedades en las regiones productoras de mango en el mundo, principalmente desórdenes de declinación de árboles y pudriciones del pedúnculo (Sakalidis *et al.*, 2011). De frutos de los tres cultivares con pudrición del pedúnculo, se aisló a *L. theobromae* y *N. parvum*, y de ramas de Aaulfo y Tommy Atkins con muerte descendente, se aisló a *N. parvum* y *L. pseudotheobromae*. Aunque las especies aisladas en este estudio muestran algunas variaciones en características morfológicas de otros estudios (Pennycook y Samuels, 1985; Burgess *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008), la amplificación con iniciadores universales que amplifican secuencias ribosomales,

producing regions around the world, principally disorders of tree decline and stem-end rot (Sakalidis *et al.*, 2011). Of fruits of the three cultivars with stem-end rot, *L. theobromae* and *N. parvum* were isolated, and from branches of Aaulfo and Tommy Atkins with dieback, *N. parvum* and *L. pseudotheobromae* were isolated. Although the species isolated in this study showed some variations in morphological characteristics from other studies (Pennycook and Samuels, 1985; Burgess *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008), the amplification with universal primers which amplify ribosomal sequences, revealed a high level of concordance in the taxonomic identification. In isolates of the same species no genetic diversity was observed. The consensus tree (Figure 3) showed the identity of nucleotide of the sequences of the study with those of Cameroon, China, Namibia, Uruguay and USA (Marincowitz *et al.*, 2008; Begoude *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2010).

Lasiopodia pseudotheobromae was reclassified by Alves *et al.* (2008) as cryptic species of *L. theobromae*

reveló un nivel elevado de concordancia en la identificación taxonómica. En aislamientos de la misma especie no se observó diversidad genética. El árbol consenso (Figura 3) mostró la identidad de nucleótidos de las secuencias del estudio con las de Camerún, China, Namibia, Uruguay y USA (Marincowitz, *et al.*, 2008; Begoude *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2010).

Lasiodiopodia pseudotheobromae fue reclasificada por Alves *et al.* (2008) como especie críptica de *L. theobromae* y la consideraron especie nueva. Desde entonces se ha reconocido en hospedantes con importancia comercial, como *Citrus* spp., *Coffea* sp., *Mangifera* spp. y *Rosa* sp. (Zhao *et al.*, 2010). Hasta ahora no había reportes de su presencia en México.

Los aislamientos identificados como *Neofusicoccum* sp. (procedentes de Nayarit) revelaron que este género presenta un evento de especiación, ya que al no definirse la especie, posiblemente *N. parvum* u otra especie del mismo género, está cambiando. La comparación de los aislamientos de *Neofusicoccum* sp. de este estudio con la base de datos del BLASTN, mostraron la secuencia *Neofusicoccum* sp. CMW28320 de Camerún como la más cercana a ellos. *Neofusicoccum* sp. se reporta causando daños en *Persea americana* (McDonald y Eskalen, 2011), *Vaccinium corymbosum* (Espinoza *et al.*, 2009) y *Vitis vinifera* (Urbez-Torres *et al.*, 2010).

Similar a lo señalado por Costa *et al.* (2010), *N. parvum* fue aislado de los cultivares Tommy Atkins y Kent y *L. theobromae* fue aislado sólo de Tommy Atkins y Aaulfo. Las diferencias de las especies de hongos en mango pueden deberse a las condiciones climáticas, la eficacia de medidas cuarentenarias, la proximidad a los endófitos que dominan la vegetación nativa (Sakalidis *et al.*, 2011) y especificidad hacia cultivares particulares de mango.

La patogenicidad de los hongos aislados de frutos se mostró al reproducir los síntomas en frutos inoculados artificialmente y al reaislarlos. *Pestalotiopsis* sp. y *Phomopsis* sp. fueron inoculadas para comparar los síntomas reportados por Johnson *et al.* (1991) y Ko, (2009) y sí coincidieron. La infección cruzada en frutos, con los aislamientos de *L. pseudotheobromae* y *N. parvum* obtenidos de ramas con muerte descendente, permitió establecer una posible asociación con pudrición del pedúnculo, ya que todos los aislamientos fueron patogénicos en los tres cultivares y produjeron síntomas similares a los de los aislamientos de frutos. Estudios de patogenicidad en ramas son necesarios

and they considered it a new species. Since then, it has been recognized in hosts of commercial importance, such as *Citrus* spp., *Coffea* sp., *Mangifera* spp. and *Rosa* sp. (Zhao *et al.*, 2010). Until now, there were no reports of its presence in México.

The isolates identified as *Neofusicoccum* sp. (from Nayarit) revealed that this genus presents an event of speciation, given that as the species is not defined, possibly *N. parvum*, or another species of the same genus, it is changing. The comparison of the isolates of *Neofusicoccum* sp. of this study, with the data base of BLASTN, showed the sequence *Neofusicoccum* sp. CMW28320 of Cameroon as the closest to them. *Neofusicoccum* sp. is reported as the cause of damage in *Persea americana* (McDonald and Eskalen, 2011), *Vaccinium corymbosum* (Espinoza *et al.*, 2009) and *Vitis vinifera* (Urbez-Torres *et al.*, 2010).

Similar to what was pointed out by Costa *et al.* (2010), *N. parvum* was isolated from the cultivars Tommy Atkins and Kent and *L. theobromae* was isolated only from Tommy Atkins and Aaulfo. The differences of the species of fungi in mango may be due to the climatic conditions, the effectiveness of the quarantine measures, the proximity to the endophytes that dominate the native vegetation (Sakalidis *et al.*, 2011) and specificity towards particular mango cultivars.

The pathogenicity of fungi isolated from fruits was shown by reproducing the symptoms in fruits artificially inoculated and re-isolated. *Pestalotiopsis* sp. and *Phomopsis* sp. were inoculated to compare the symptoms reported by Johnson *et al.* (1991) and Ko (2009) and they coincided. The infection crossed in fruits, with the isolates of *L. pseudotheobromae* and *N. parvum* obtained from branches with dieback, made it possible to establish a possible association with stem-end rot, given that all of the isolates were pathogenic in the three cultivars and produced symptoms similar to those of the fruit isolates. Studies of pathogenicity in branches are necessary to confirm the association obtained here and if *N. parvum* causes regressive death of mango trees, as this disease is commonly attributed to *L. theobromae*. The means of infection of pathogenic fungi should be known to select management practices that reduce the inoculums and infection in the hosts. The species of the family Botryosphaeriaceae can infect the plants through endophytic colonization in lesions or seeds (Slippers and Wingfield, 2007; Sakalidis *et al.*,

para confirmar la asociación obtenida aquí y si *N. parvum* causa muerte regresiva de árboles de mango, pues esta enfermedad comúnmente se atribuye a *L. theobromae*. La vía de infección de hongos patógenos debe conocerse para seleccionar prácticas de manejo que reduzcan el inóculo e infección en los hospedantes. Las especies de la familia Botryosphaeriaceae pueden infectar a las plantas a través de colonización endofítica por heridas o semillas (Slippers y Wingfield, 2007; Sakalidis *et al.* 2011). La información de las fuentes de inóculo, modo y tiempo de infección y respuesta de los patógenos en la postcosecha a las temperaturas de almacenamiento puede contribuir en el control de esas patologías.

CONCLUSIONES

Los hongos asociados con la pudrición del pedúnculo de frutos de mango, en los estados de la Costa del Pacífico de México, corresponden a *L. theobromae* y *N. parvum*, y se detectó a *Neofusicoccum* sp. Los asociados con la muerte descendente de ramas corresponden a *L. pseudotheobromae* y *N. parvum*. Se evidenció una posible asociación de pudrición del pedúnculo con muerte descendente, ya que todos los aislamientos de *L. pseudotheobromae* y *N. parvum*, obtenidos de ramas con muerte descendente al inocularlos en pedúnculos de frutos de Ataulfo, Kent y Tommy Atkins fueron patogénicos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al M. C. Juan Manuel Tovar Pedraza, M. C. Luis Alfonso Aguilar Pérez (Fitopatología, Colegio de Postgraduados) y al Ing. Jesús Orozco Santos (CESAVENAY) por su apoyo en la recolección de material vegetal. Al Colegio de Postgraduados por el financiamiento otorgado con el Fideicomiso revocable de administración e inversión Núm. 167304 para el establecimiento y operación de los fondos para la investigación científica y desarrollo tecnológico.

LITERATURA CITADA

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

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

2011). The information of the sources of inoculum, means and time of infection and response to the pathogens in postharvest to the storage temperatures may contribute to the control of these pathologies.

CONCLUSIONS

The fungi associated with stem-end rot in mango fruits in the states of the Pacific Coast of México correspond to *L. theobromae* and *N. parvum*, and *Neofusicoccum* sp. was also detected. Those associated with dieback of branches correspond to *L. pseudotheobromae* and *N. parvum*. A possible association was evidenced of stem-end rot with dieback, given that all of the isolates of *L. pseudotheobromae* and *N. parvum* obtained from branches with dieback and inoculated in peduncles of fruits of Ataulfo, Kent and Tommy Atkins were pathogenic.

—End of the English version—

-----*

Barnett, L. H. and B. B. Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.

Begoude, A. D., B. Slippers, M. J. Wingfield, and J. Roux, 2010. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycol. Prog.* 9: 101-123.

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

Costa, V. S. de O., S. J. Michereff, R. B. Martins, C. A. T. Gava, E. S. G. Mizubuti, and M. P. S. Câmara. 2010. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 127: 509-519.

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

Espinoza, J. G., E. X. Briceño, E. R. Chavez, J. R. Urbez-Torres, and B. A. Latorre, 2009. *Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. *Plant Dis.* 93: 1187-1194.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nuc. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.

- Javier-Alva, J., D. Gramaje, L. A. Alvarez, and J. Armengol. 2009. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with dieback of mango trees in Peru. *Plant Dis.* 93: 426.
- Johnson, G. I., A. J. Mead, A. W. Cooke, and J. R. Dean. 1991. Mango stem end rot pathogens - Infection levels between flowering and harvest. *Ann. Appl. Biol.* 119: 465-473.
- Khazada, M. A., A. M. Lodhi, and S. Saleem. 2004. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. *Pak. J. Bot.* 36: 181-189.
- Ko, Y., C. W. Liu, C. Y. Chen, S. Maruthasalam, and C. H. Lin. 2009. First report of stem end rot of mango caused by *Phomopsis mangiferae* in Taiwan. *Plant Dis.* 93: 764.
- Marincowitz, S., J. Z. Groenewald, M. J. Wingfield, and P. W. Crous. 2008. Species of Botryosphaeriaceae occurring on Proteaceae. *Persoonia* 21: 111-118.
- McDonald, V. and A. Eskalen, 2011. Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Dis.* 95: 1465-1473.
- Mirzaee, M. R., M. Azadvar, and D. Ershad. 2002. The incidence of *Lasiodiplodia theobromae* the cause of fruit and stem-end rot of mango in Iran. *Iran. J. Plant Pathol.* 38: 62-65.
- Molina, G. E., H. V. Silva R., and S. García M. 2012. First report of black spots on avocado fruit caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. *Plant Dis.* 96: 287.
- Ni, H. F., R. F. Liou, T. H. Hung, R. S. Chen, and H. R. Yang. 2010. First report of fruit rot disease of mango caused by *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum mangiferae* in Taiwan. *Plant Dis.* 94: 128.
- Pennycook, S. R. and G. J. Samuels. 1985. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* 24: 445-458.
- Perez, C. A., M. J. Wingfield, B. Slippers, N. A. Altier, and R. A. Blanchette, 2010. Endophytic and canker-associated Botryosphaeriaceae occurring on non-native *Eucalyptus* and native Myrtaceae trees in Uruguay. *Fungal Divers.* 41: 53-69.
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. Commonwealth Mycological Institute. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 519: 1-3.
- Sakalidis, M. L., J. D. Ray, V. Lanoiselet, G. E. StJ. Hardy, and T. I. Burgess. 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. *Eur. J. Plant Pathol.* 130: 379-391.
- Slippers, B., G. I. Johnson, P. W. Crous, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia* 97: 99-110.
- Slippers, B. and M. J. Wingfield. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biol. Rev.* 21: 90-106.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 696 p.
- Tamura, K., J., M. N. Dudley, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-80.
- Urbez-Torres, J. R., M. Battany, L. J. Bettiga, C. Gispert, G. McGourty, J. Roncoroni, R. J. Smith, P. Verdegaal, and W. D. Gubler. 2010. Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Dis.* 94: 717-724.
- Zhao, J. P., Q. Lu, J. Liang, C. Decock, and X. Y. Zhang, 2010. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, a new record of pathogenic fungus from some subtropical and tropical trees in southern China. *Cryptogamie Mycologie.* 31: 431-439.