

Etiología de la pudrición del cogollo de la piña (*Ananas comosus*. L. Merrill) cultivar MD2 en Isla, Veracruz, México

Etiology of the heart rot of pineapple (*Ananas comosus*. L. Merrill) MD2 cultivar in Isla, Veracruz, México

César Joel Espinosa-Rodríguez¹, Daniel Nieto-Angel^{2*}, Carlos De León-García de Alba², Ángel Villegas-Monter¹, Luis Alfonso Aguilar-Pérez², Victoria Ayala-Escobar². ¹Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. ²Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo Texcoco, Edo. de México C.P. 56230. *Correspondencia: (dnieto@colpos.mx).

Recibido: Julio 19, 2014

Aceptado: Diciembre 28, 2014

Espinosa Rodríguez CJ, Nieto Ángel D, De León García de Alba C, Villegas Monter A, Aguilar Pérez LA y Ayala Escobar V. 2015. Etiología de la pudrición del cogollo de la piña (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar MD2 en Isla, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 104-115.

Resumen. La pudrición del cogollo de la piña (*Ananas comosus* L. Merrill) es una enfermedad con alta incidencia en la regiones productoras de Veracruz, México, el cultivar MD2 es el más susceptible. El objetivo de este estudio fue identificar morfológica y filogenéticamente el agente causal de la enfermedad. Muestras de piña se colectaron entre septiembre de 2011 y marzo de 2012. De las hojas basales en contacto con el cogollo con pudrición se aisló a *Phytophthora*. Se realizó la identificación morfológica y molecular utilizando los iniciadores ITS6 e ITS4. En la caracterización morfológica se identificó a *Phytophthora nicotianae*. La identificación molecular tuvo 100% de similaridad con *Phytophthora nicotianae*. Se realizaron pruebas de patogenicidad en coronas de piña *in vitro* en agua y vástagos (gallos) de 5 meses *in vivo* en suelo. Los síntomas en corona se presentaron a los 7 y 9 días

Abstract. The heart rot of pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) is a disease with a high incidence in the production areas of Veracruz, Mexico; the MD2 cultivar is the most susceptible. The objective of this study was to identify, morphologically and phylogenetically, the causative agent of the disease. Pineapple samples were collected between September 2011 and March 2012. *Phytophthora* was isolated from the basal leaves that came in contact with the heart that presented signs of rot. The morphological and molecular identification was done using the ITS6 and ITS4 initiators. *Phytophthora nicotianae* was identified in the morphological characterization. The molecular identification had a 100 % similarity with *Phytophthora nicotianae*. Pathogenicity tests were done on *in vitro* pineapple crowns in water and *in vivo* stems (roots) of 5 months in soil. Crown symptoms appeared on days 7 and 9 in 100% of the crowns and on days 16 to 20 in 95% of the inoculated stems. Based on the morphology, phylogenetics and pathogenicity test are considered the first report of *Phytophthora nicotianae* in pineapples in Mexico.

Keywords: Heart rot, *Ananas comosus*, *Phytophthora nicotianae*.

en 100 % de coronas y de 16-20 días en un 95 % de vástagos inoculados. En base a morfología, filogenia y prueba de patogenicidad se considera el primer reporte de *Phytophthora nicotianae* en piña en México.

Palabras clave: Pudrición del cogollo, *Ananas comosus*, *Phytophthora nicotianae*.

La piña (*Ananas comosus* L. Merrill) es nativa de las regiones tropicales y subtropicales de América del Sur, pertenece a la familia de las bromeliáceas, del orden Bromeliales y a la especie *Ananas comosus*.

Según estimaciones de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se calcula que para 2014 la producción mundial de frutas tropicales llegará a 82 millones de toneladas; el 78 % corresponde a las “frutas principales” (mango, piña, aguacate y papaya) y el 22 % a las “frutas secundarias” (litchi, rambután, guayaba y maracuyá). Los países en desarrollo representan alrededor del 98 % de la producción total, mientras que los países desarrollados representan el 80 % del comercio mundial de importaciones (FAOSTAT, 2013).

La producción de piña es de importancia económica para las zonas tropicales y subtropicales del mundo, es el segundo fruto tropical producido después del mango. Los principales productores de piña se encuentran en Asia-Pacífico (Tailandia, India, Filipinas, China, Vietnam y Malasia) con el 47 % de la producción mundial. En América Latina los principales productores son Brasil y Costa Rica, ocupando el segundo y tercer lugar a nivel mundial respectivamente; México ocupa el décimo lugar. En el año 2012 la superficie total cultivada con piña fue de aproximadamente 17 mil ha, con una producción total aproximada de 760 mil t, siendo los principales productores los estados de Veracruz, Oaxaca, Nayarit y Tabasco (FAOSTAT, 2013; SIAP, 2013).

The pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) is native to the tropical and subtropical regions of South America; it belongs to the Bromeliaceae, of the Bromeliales order and the *Ananas comosus* species.

The Food and Agriculture Organization (FAO) estimates that by 2014 the global production of tropical fruit will reach 82 million tons; 78 % corresponding to the “main fruits” (mango, pineapple, avocado and papaya) and 22 % to the “secondary fruits” (lychee, rambutan, guava, and passion fruit). Developing countries represent around 78 % of the total production, while the developed countries represent 80 % of the world trade (FAOSTAT, 2013).

The production of pineapple is financially relevant for the tropical and subtropical areas of the world; it is the second produced tropical fruit after the mango. The main pineapple producers are located in the Asia-Pacific (Thailand, India, Philippines, China, Vietnam and Malaysia) holding 47% of the global production. In Latin America the main producers are: Brazil and Costa Rica, ranking second and third place respectively on a global scale; Mexico ranks tenth. In 2012, the total area for pineapple cultivation was approximately 17 thousand hectares, with a total approximate production of 769 thousand tons, the main producers being the states of Veracruz, Oaxaca, Nayarit and Tabasco (FAOSTAT, 2013; SIAP, 2013).

The most cultivated crop in Mexico is the ‘Smooth Cayenne’ pineapple, occupying 80 % of the total cultivated surface (Rebolledo *et al.* 2006); in the last two decades, the main pineapple producers in the world, “Del Monte” and “Dole”, released a new cultivar, the MD2 hybrid (‘Gold Pineapplehoney’), created in Hawaii. The MD2 cultivar produces fruit with yellower pulp, sweeter and less acidic than other cultivars. It possesses a total of 15 to 17° soluble solids, while the ‘Smooth Cayenne’ possesses 12 to 15°; it also has a higher

El cultivar más sembrado en México es ‘Cayena Lisa’ con 80% de la superficie total sembrada (Rebolledo *et al.* 2006); en las últimas dos décadas “Del Monte” y “Dole”, las dos principales empresas productoras de piña en el mundo liberaron un nuevo cultivar, el híbrido MD2 (‘Piña miel’), originado en Hawai. El cultivar MD2 genera frutos con pulpa más amarilla, más dulce y con menor acidez que otros cultivares, posee de 15 a 17° de sólidos solubles totales, mientras que ‘Cayena Lisa’ tiene de 12 a 15° ; también cuenta con un mayor contenido de vitamina A y C, además de que el fruto adquiere una forma más cilíndrica y no con forma de botella, lo que facilita su manejo en su industrialización (FAOSTAT, 2013; Williams and Fleisch, 1992; Rebolledo *et al.*, 1998; Rebolledo *et al.*, 2011; Fold and Gough, 2008; Chan *et al.*, 2002; Morgan and Thompson, 2000).

El principal problema que enfrenta el cultivar MD2 en las zonas productoras de Veracruz es la pudrición del cogollo. Coppens *et al.* (1997) han reportado que esta enfermedad ha causado graves pérdidas económicas en Australia, Hawái, Filipinas, Sudáfrica y Tailandia. Rebolledo *et al.* (2011) mencionan que es causado por *Erwinia chrysanthemi* y Espinosa and Adam (1972), aluden esta enfermedad a *Phytophthora nicotianae*. El objetivo del presente estudio fue identificar al agente causal de la pudrición del cogollo de la piña para la localidad de Isla, Veracruz, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y muestreo. El área de estudio se localizó en localidad en la Isla, Veracruz, México a 18° 8’ N y 95° 35’ O, 60 msnm de altitud, con clima cálido-húmedo, temperatura promedio de 24.9 °C y precipitación pluvial media anual de 2316 mm. De Septiembre de 2011 a Marzo de 2012

vitamin A and C content, while additionally having a more cylindrical shape and not bottle-like, which facilitates its handling during its industrialization (FAOSTAT, 2013; Williams and Fleisch, 1992; Rebolledo *et al.*, 1998; Rebolledo *et al.*, 2011; Fold and Gough, 2008; Chan *et al.*, 2002; Morgan and Thompson, 2000).

The main problem faced by the MD2 cultivar in the production regions of Veracruz is the heart rot of the pineapple. Coppens *et al.* (1997) have reported that this disease has caused severe financial losses in Australia, Hawaii, Philippines, South Africa and Thailand. Rebolledo *et al.* (2011) mention that it is caused by *Erwinia chrysanthemi* and Espinosa and Adam (1972), attribute this disease to *Phytophthora nicotianae*. The objective of this study is to identify the causative agent of the heart rot of the pineapple for the municipality of Isla, Veracruz, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Study site and sampling. The study area was located in Isla, Veracruz, Mexico at 18° 8’ N y 95° 35’ O, 60 m above sea level, in warm-humid weather, average temperature of 24.9 °C and average annual rainfall of 2,316 mm. From September 2011 to March 2012, 40 plants with heart rot characteristic symptoms were collected and processed in the laboratory of post-harvest fruit diseases at the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico.

Isolation. The sick pineapple plants were washed under a stream of clean water to eliminate soil excess. 5 mm² pieces between healthy and sick tissue were cut in basal leaves. They were disinfested through immersion in a solution of 3 % Sodium Hypochlorite for 4 min., rinsing 4 times with distilled water and dried with sterile paper

se recolectaron 40 plantas con síntomas característicos de pudrición del cogollo y se procesaron en el Laboratorio de enfermedades de frutos en postcosecha del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Aislamiento. Las plantas de piña enfermas se lavaron bajo el chorro de agua potable para eliminar exceso de tierra. En hojas basales, se cortaron trozos de 5 mm² entre tejido sano y enfermo, se desinfectó por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 3 % durante 4 min, con 4 enjuagues con agua destilada estéril y se secaron con toallas de papel absorbente estéril. Un total de 600 fragmentos se sembraron en tres medios de cultivo: papadextrosa- agar (PDA), agar- nutritivo, V8- agar (pimaricina 10 µg/L, ampicilina 292 µg/L, rifampicina 10 µg/L, pentacloronitrobenzeno 0.10 g/L e himexazol 0.25 µg/L), con un total de 150 cajas sembradas. Todas las cajas de Petri se incubaron a 28 °C en luz blanca como lo recomiendan Jeffers and Martin, 1986 y Erwin and Ribeiro, 1996. Se realizó la purificación de aislamientos por punta de hifa, una vez purificadas se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo V8- agar (acidificado con ácido láctico al 25 %) para su caracterización.

Por otra parte, se cortaron 20 hojas basales de las plantas enfermas con pudrición, se desinfestaron como lo descrito para hojas basales, se colocaron en agua destilada estéril a 28 °C en luz blanca. Después del segundo día se observó crecimiento de micelio color blanquecino y de cada hoja se transfirió segmento de micelio en medio de cultivo jugo de verduras V8- acidificado.

Preparación del inóculo. A partir de aislamientos de *Phytophthora* en medio de cultivo PDA, se tomaron fragmentos que se colocaron en agua destilada estéril para formación de esporangios y liberación de zooporas. Con la cámara de Neubauer se

towels. A total of 600 fragments were cultivated in three culture mediums: potato- dextrose-agar (PDA), nutrient agar, V8- agar (Natamycin 10 µg/L, ampicillin 292 µg/L, rifampicin 10 µg/L, pentachloronitrobenzene 0.10 g/L and hymexazol 0.25 µg/L), with a total of 150 cultivated boxes. All Petri dishes were incubated at 28 °C in white light as recommended by Jeffers and Martin, 1986 and Erwin and Ribeiro, 1996. The purification of isolated samples* was done through hyphal head, once purified they were transferred to Petri dishes with v8-agar culture mediums (acidified with lactic acid at 25 %) for their characterization.

Additionally, 20 basal leaves were cut from the rot diseased plants, they were disinfested as it was described for the basal leaves and they were placed in distilled water at 28°C in white light. After the second day, white colored mycelium growth was observed, and a segment of mycelium was transferred from each leaf in acidified vegetable juice V8 culture medium.

Preparation of the inoculum. From the *Phytophthora* isolates in PDA culture medium, fragments were taken and placed in distilled water for the formation of sporangiums and the release of zoospores. A suspension of zoospores was prepared with the Neubauer camera, with a concentration of 10⁸ zoospores ml⁻¹ (Rodríguez *et al.* 2002).

Pathogenicity tests. *In vitro* pathogenicity tests were carried out in 60 crowns and 80 *in vivo* stems. Both materials were sun dried during 5 days and disinfected with 3 % sodium hypochlorite for 4 min. and were washed 4 times with distilled water. 4 lesions were inflicted in 60 crowns with a needle in the median stem of the crown, 30 of the crowns were placed in a recipient with 300 ml of

preparó una suspensión de zoosporas a una concentración de 10^8 zoosporas ml^{-1} (Rodríguez *et al.*, 2002).

Pruebas de patogenicidad. Se realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro* en 60 coronas y 80 vástagos *in vivo*, ambos materiales se secaron a la luz solar durante 5 días y se desinfectaron con hipoclorito de sodio 3 % por 4 min y se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. En las 60 coronas se realizaron 4 lesiones con aguja en el tallo medio de la corona, 30 de las coronas se colocaron en recipiente con 300 ml de la suspensión de esporas, 30 coronas se utilizaron como testigos y solamente se le adicionó agua destilada estéril sin zoosporas. El tratamiento se colocó en luz blanca a 28 °C hasta la aparición de síntomas. Para las pruebas *in vivo* se utilizaron vástagos de 5 meses de edad sembrados en bolsas de polietileno en una mezcla de tierra y tezontle (3:2 v/v). En 40 vástagos se removió la tierra 8 cm alrededor del cogollo, se les hicieron cuatro lesiones con una aguja esterilizada en el tallo medio y se agregaron 300 ml del inóculo junto con fragmentos de micelio con esporangios y se cubrió de nuevo con la tierra removida, a los 40 testigos se realizó la misma técnica, pero solo se utilizó agua destilada estéril. A las plantas se les colocó otra bolsa de polietileno hasta la aparición de síntomas. En ambos tratamientos el tejido dañado se sembró en medio de cultivo V8- agar acidificado.

Caracterización morfológica. Se caracterizó en base a crecimiento micelial, pigmentación y formación de estructuras de reproducción de la colonia creciendo en PDA y bajo luz blanca continua a 28 °C. La identificación del género se hizo con las claves de Erwin and Ribeiro (1996), y para especie con las descritas por Gallegly and Hong (2008).

the suspension of spores, 30 crowns were used as controls and were only added sterile water without zoospores. The treatment was placed under white light at 28°C until the appearance of symptoms. For the *in vivo* tests, 5 month old stems were used, cultivated in polyethylene bags in mixtures of soil and tezontle (3:2 v/v). In 40 stems, the soil was removed at about 8 cm around the heart of the pineapple, 4 lesions were inflicted on the median stem with the sterilized needle and 300 ml of inoculum were added along with mycelium fragments with sporangiums and was covered again with the removed soil. The same technique was applied to the 40 control samples, but only distilled water was used. Another polyethylene bag was placed on the other plants until the appearance of symptoms. For both treatments the damaged tissue was cultivated in acidified V8-agar culture.

Morphological characterization. It was characterized based on the mycelial growth, pigmentation and formation of reproduction structures of the colony growing in PDA and under perpetual white light at 28°C. The identification of the genus was done through the Erwin and Ribeiro (1996) key, and for the species with the ones described by Gallegly and Hong (2008).

Molecular Identification. The extraction of DNA was done from a 6 day growth cultivar in a V8 liquid medium at 28 °C, using the CTAB protocol (Doyle and Doyle 1990). The transcribed internal space of the ribosomal DNA was amplified using the ITS6 and ITS4 initiators (White *et al.* 1990). The sequences obtained were compared with the database in the National Center for Biotechnology Information NCBI (2012), USA (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Identificación molecular. La extracción del ADN se hizo a partir de un cultivo de 6 días de crecimiento en medio líquido V8 a 28 °C, utilizando el protocolo de CTAB (Doyle and Doyle, 1990). El espacio transcrito interno del ADN ribosomal se amplificó utilizando los iniciadores ITS6 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del Banco de Genes del centro NCBI (2012), USA (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTADOS

Aislamiento de microorganismos. En los diferentes medios se observó que en el medio de cultivo V8 – agar con antibiótico, se aisló con mayor frecuencia a *Phytophthora* sp. y en menor frecuencia en agar-nutritivo y PDA. En medio de cultivo agar nutritivo y PDA se aisló con mayor frecuencia a *Pythium*, los porcentajes se muestran en el Cuadro 1.

De las 20 hojas colocadas en frascos con agua destilada estéril, a los 2 días se observó el crecimiento de micelio (Figura 1) y en los fragmentos sembrados en PDA y V8-agar acidificado se desarrollaron colonias características de *Phytophthora* sp.

Pruebas de patogenicidad. En las pruebas *in vitro*, los síntomas mostraron un color verde pálido, puntas de hojas necrosadas a los 7-9 días. Además se observó hojas centrales podridas y en el centro de la roseta había una coloración café tenue y micelio de *Phytophthora* (Figura 2), el 100 % de las coronas inoculadas se enfermaron. Los testigos no presentaron síntomas ni signos y desarrollaron un sistema radical abundante. A partir del tejido necrosado, se realizaron nuevamente aislamientos en medio V8-Agar acidificado de donde se aisló a *Phytophthora nicotianae*. Para las pruebas *in vivo*

RESULTS

Isolation of microorganisms. It was observed among the different mediums that in the V8 agar with antibiotic culture medium, *Phytophthora* sp. was isolated with more frequency, and less frequently in the nutrient and PDA agars. In the nutrient and PDA agars, *Pythium* was isolated with more frequency, the percentages are shown in Table 1.

From the 20 leaves placed in flasks with distilled water, the growth of mycelium was observed after 2 days (Figure 1), and the fragments cultivated in PDA and acidified V8- agar developed colonies characteristic of *Phytophthora* sp.

Pathogenicity tests. In the *in vitro* tests, the symptoms presented a pale green color and necrosis on the tips of the leaves within 7 to 9 days. Furthermore, rotten middle leaves presented a light brown color in the middle of the rosette, and *Phytophthora* mycelium could also be observed (Figure 2). 100 % of the inoculated crowns got the disease. The control samples did not present any symptoms or signs and developed an abundant radical system. From the necrotic tissue, isolation was once again performed in acidified V8- Agar wherein *Phytophthora nicotianae* was isolated. For the *in vivo* tests, the symptoms and signs took 16 days to manifest, starting with a change in the color of the leaves to a lighter green, the tips of which were necrotic around the heart of the pineapple. Within 20 days, heart rot was evident, the center of the rosette was brown and mycelium was present, the base of the middle leaves had a putrid smell; 38 (95%) of the 40 inoculated plants showed symptoms of the sickness. The control samples did not present symptoms or signs of the disease. From the necrotic leaves isolations were performed in acidified V8- agar culture medium,

Cuadro 1. Porcentaje de microorganismos aislados de plantas de piña (*Ananascomosus* L. Merrill) cultivar MD-2 con signos y síntomas de pudrición del cogollo. Isla, Veracruz, México, Verano del 2011.

Table 1. Percentage of isolated microorganisms in pineapple plants (*Ananascomosus* L. Merrill) MD2 cultivar with signs and symptoms of heart rot. Isla, Veracruz, Summer, 2011.

Medio de cultivo	Oomicetes		Bacterias y hongos saprófitos
	<i>Phytophthora</i> spp.	<i>Pythium</i> spp.	
V8 + Antibióticos	180/200 (90 %)	0/200 (0 %)	0/200 (0 %)
Agar Nutritivo	48/200 (24 %)	22/200 (11 %)	10/200 (55 %)
PDA	11/200 (5.5 %)	45/200 (22.5 %)	22/200 (11 %)

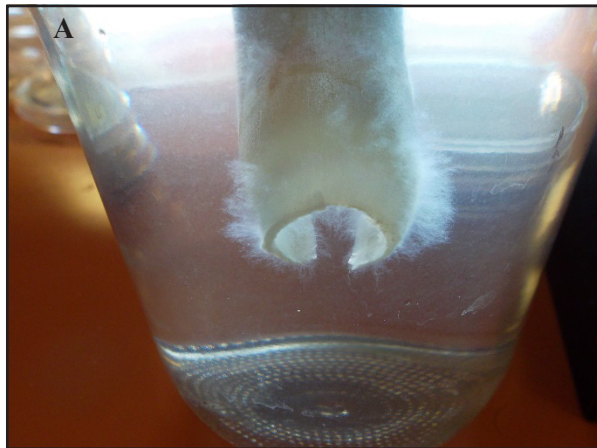


Figura 1. A) y B) Micelio de *Phytophthora* sp. desarrollado a dos días en agua destilada estéril, en hojas basales de piña colectadas en campo.

Figure 1. A) and B) *Phytophthora* sp. Mycelium grown in distilled water for two days, in basal leaves collected from the field.

los síntomas y signos tardaron 16 días en manifestarse, iniciando con un cambio en la coloración de las hojas a verde más claro, las puntas de estas se necrosaron alrededor del cogollo. A los 20 días la pudrición del cogollo era evidente, el centro de la roseta mostró una coloración café y micelio, la base de las hojas centrales con olor putrefacto; 38 (95 %) de las 40 plantas inoculadas mostraron síntomas de la enfermedad. Los testigos no presentaron síntomas ni signos de la enfermedad. De las hojas necrosadas se hicieron aislamientos en medio

where the presence of *Phytophthora nicotianae* was corroborated.

Morphological characterization. The growth of mycelial hyaline was carried out in a V8- agar culture medium, non-defunct, spherical and/or limoniform sporangiums with a prominent papilla, the average size of 100 sporangiums was 44.6 x 36.8 μm ; spherical, non-papillate chlamydo spores were present, terminal and intercalated hyalines of 30.2 μm (average of 100 chlamydo spores) (Figure

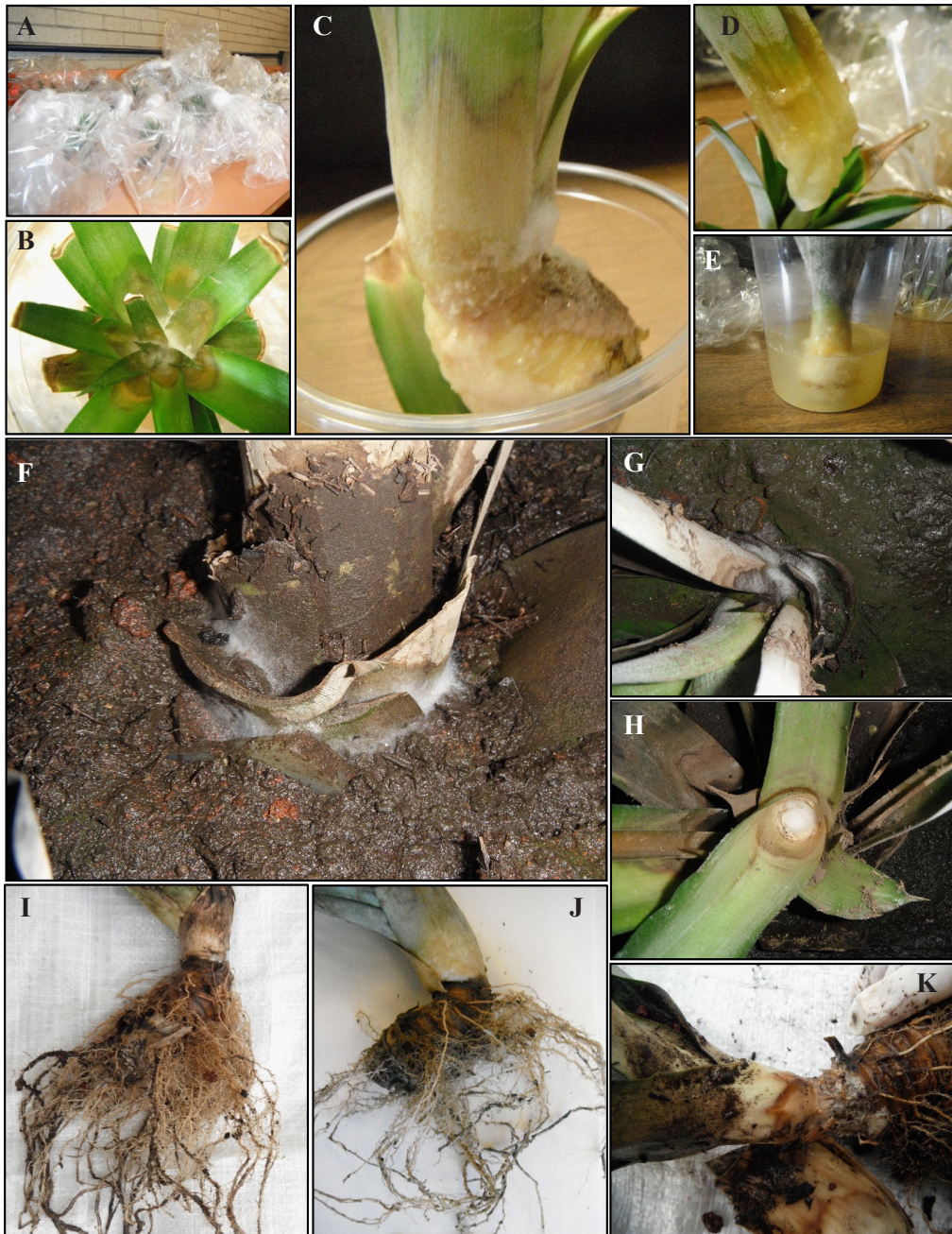


Figura 2. Síntomas y signos de la pudrición del cogollo de la piña. A) Pruebas *in vitro* de la pudrición del cogollo de la piña. B) Signos y síntomas en coronas inoculadas. C) Pudrición del cogollo. D) Hoja de corona con pudrición. E) Corona de piña 9 ddi. F) Signos del oomiceto en plantas inoculadas. G) Signos y síntomas en plantas inoculadas en invernadero. H) Cogollo podrido de la planta de piña. I) Cogollo y raíz de planta testigo de prueba *in vivo*. J) Cogollo y raíz de planta inoculada. K) Planta de piña 16 ddi.

Figure 2. Symptoms and signs of heart rot of the pineapple. A) *In vitro* tests of the heart rot of the pineapple. B) Signs and symptoms in inoculated crowns. C) Heart Rot. D) Crown leaf with rot. E) Pineapple crown 9 ddi. F) Signs of the oomycete in inoculated plants. G) Signs and symptoms in inoculated plants in greenhouses. H) Rotten heart of the pineapple plant. I) Heart and root *in vivo* of the control plant. J) Heart and root of the inoculated plant. K) Pineapple plant 16 ddi.

V8-agar acidificado, donde se corroboró la presencia de *Phytophthora nicotianae*.

Caracterización morfológica. En medio de cultivo V8-agar se desarrollo crecimiento micelial hialino, esporangios no caducos, esféricos a limoniformes con una papila prominente, el tamaño promedio de 100 esporangios fue de $44.6 \times 36.8 \mu\text{m}$; se presentaron clamidosporas esféricas, no papiladas, hialinas terminales e intercalares de $30.2 \mu\text{m}$ (promedio de 100 clamidosporas) (Figura 3). La formación de esporangios en agua destilada estéril se presentó a

3). The formation of sporangiums in distilled water appeared within 48 hrs. under perpetual white light. The characteristics coincide with those reported by Erwin and Ribeiro (1996) and Gallegly and Hong (2008) for *Phytophthora nicotianae*.

Molecular identification. The product of amplification that was obtained with the ITS4 and ITS6 initiators was of 850 bp (fig. 3). The comparison of the nucleotide sequence of the isolate showed 100% similarity with the *Phytophthora nicotianae* sequence.

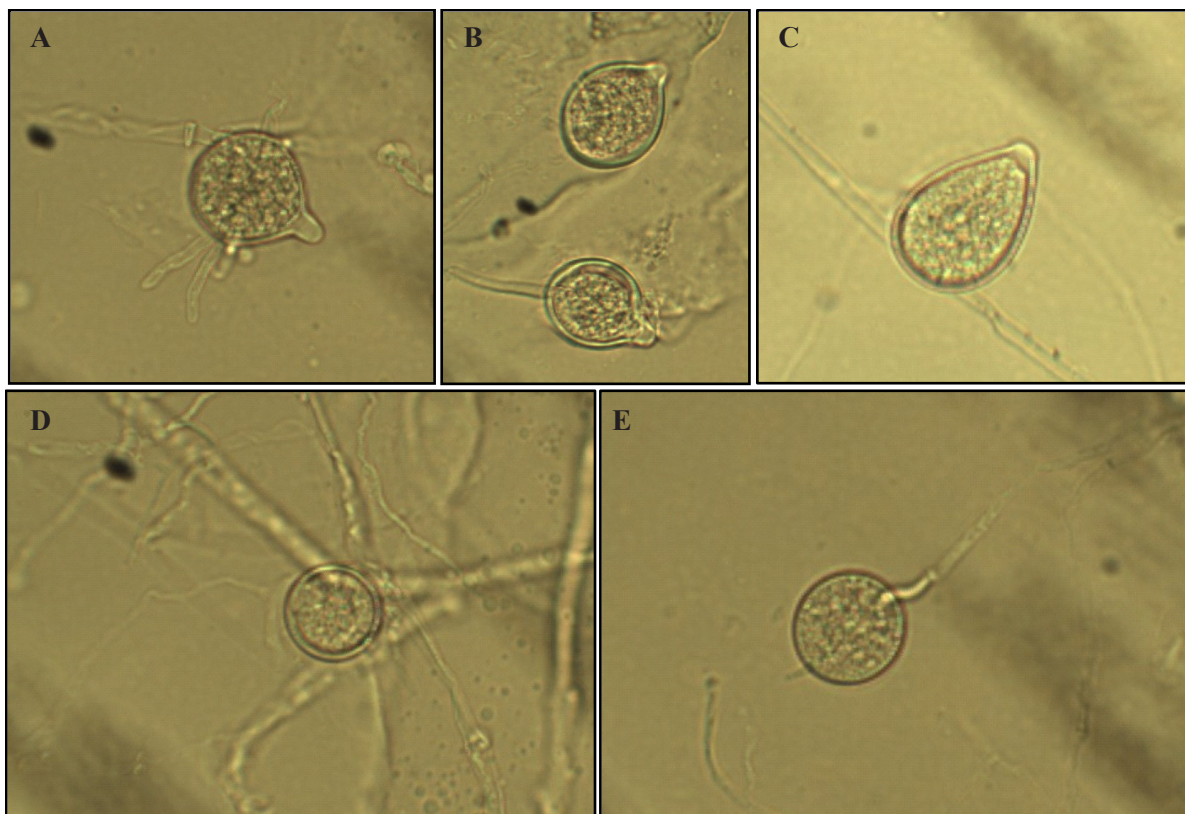


Figura 3. Estructuras asexuales de *Phytophthoranicotianae*. A) Esporangio esférico. B) Esporangio limoniforme. C) Esporangio ovoide. D) Clamidospora intercalar. E) Clamidospora terminal.

Figure 3. Asexual structures of *Phytophthoranicotianae*. A) Spherical Sporangium. B) Limoniform Sporangium. C) Ovoid Sporangium. D) Interspersed Chlamyospore. E) Terminal Chlamyospore.

las 48 hs. en exposición continua bajo luz blanca. Las características coinciden con las reportadas por Erwin and Ribeiro(1996) y Gallegly and Hong (2008) para *Phytophthora nicotianae*.

Identificación molecular. El producto de amplificación que se obtuvo con los iniciadores ITS4 e ITS6 fue de 850 bp (fig 3). La comparación de la secuencia de nucleótidos del aislamiento mostró 100% de similitud con la secuencia de *Phytophthora nicotianae*.

DISCUSIÓN

Los resultados de pudrición del cogollo *in vivo* e *in vitro* similares a los observados en los campos de cultivo de Isla, Veracruz, que inician con lesiones acuosas en la base de las hojas (tejido sin clorofila) y el cogollo, las hojas se tornan a un verde más claro, las puntas de estas se necrosan y desarrollan un olor fétido característico es causado por *Phytophthora nicotianae* y coincide con lo descrito por Espinosa y Adam (1972) en México y por Joy y Sindhu (2012) en la India respectivamente. Estos síntomas probablemente se deban a la obstrucción física del sistema vascular causado por el crecimiento de hifas y a la penetración de otros organismos secundarios (hongos y bacterias), aumentando la formación de gomas que se originan por la oxidación y acumulación de los residuos de la degradación celular, como sucede en plantas ornamentales (Arévalo-Galarza, 2012; Agrios, 2005). Posterior a la inoculación y a la formación de zoosporas, éstas son atraídas a la zona de elongación y diferenciación de la raíz, en donde forman quistes, e inclusive invaden a las raíces secundarias y no a las puntas (Galiana *et al.*, 2005; Attard *et al.*, 2010). La mayor incidencia

DISCUSSION

The *in vivo* and *in vitro* heart rot results similar to those observed in the cultivation fields of Isla, Veracruz, that start with aqueous lesions at the base of the leaves (tissue without chlorophyll) and the heart of the fruit, the leaves turn a lighter green, the tips become necrotic and develop a characteristic putrid smell, all caused by *Phytophthora nicotianae*, coinciding with the description by Espinosa and Adam (1972) in Mexico and by Joy and Sindhu (2012) in India. These symptoms are probably present due to the physical obstruction of the vascular system caused by the growth of hyphae and the penetration of other secondary organisms (fungi and bacteria), increasing the formation of gums that originate due to oxidation and the accumulation of cellular degradation residues, as happens with ornamental plants (Arévalo-Galarza, 2012; Agrios, 2005). Subsequent to inoculation and the formation of zoospores, these are attracted to the elongation zone and differentiation of the root, where they form cysts, and even invade the secondary roots and not the tips (Galiana *et al.*, 2005; Attard *et al.*, 2010). Most cases of heart rot in pineapples in the sampling areas were observed during the rainy season, with temperatures that oscillated between 24-26 °C and a relative humidity of 90-100 %; the high relative humidity induces the development of the diseases caused by *Phytophthora* sp. in pineapple plantations (Duniway, 1983).

Additionally, when cultivating in slope areas, cultural labors (fertilization, weed control, soil removal, etc.) and lesions caused by other organisms (nematodes and rodents) to the radical system, facilitate the dispersion and the infection risk by *Phytophthora* sp. as mentioned by Erwin and Ribeiro, 1996, Elliot, 1989, Jung and Blaschke, 2004 and; Galiana *et al.*, 2005.

de pudrición del cogollo de la piña en el área de muestreo se observó en la temporada de lluvia, con temperaturas que oscilan entre 24 - 26 °C y una humedad relativa del 90 -100 %; la alta humedad relativa induce el desarrollo de las enfermedades causadas por *Phytophthora* sp. en el cultivo de piña (Duniway, 1983).

Adicionalmente al sembrar en áreas con pendiente, labores culturales (fertilización, control de malezas, remoción del suelo, etc.) y lesiones causadas por otros organismos (nematodos y roedores) al sistema radical, facilitan la dispersión y el riesgo de infección por *Phytophthora* sp. como lo mencionan Erwin y Ribeiro, 1996, Elliott, 1989 Jung y Blaschke, 2004y ; Galiana *et al.*, 2005.

CONCLUSIÓN

Las pruebas de patogenicidad, así como la identificación morfológica y caracterización molecular, confirmaron que *Phytophthora nicotianae* es el agente causal de la pudrición del cogollo de la piña en la localidad de Isla, Veracruz, México.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5a Ed. Elsevier Academic Press. New York. 922 p.
- Arévalo-Galarza, L., García-Osorio, C. y Rosas-Saito, G.H. 2012. Factores que afectan la vida de florero en flores de corte. Agroproductividad 5 (3):28-35.
- Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre N., and Keller, H. 2010. The immediate activation of defense responses in Arabidopsis roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. New Phytologist 187 (2): 449-460
- Chan, Y. K., Coppens, d'Eeckenbrugge G, Sanewski, G. M. 2002. Breeding and variety improvement. P. 33-35 In: Bartholomew, D.P., Paull, R.E., Rohrbach, K.G. (eds.) The pineapple, botany, production and uses. CABI Publishing, New York.

CONCLUSION

Pathogenicity tests, as well as morphological identification and molecular characterization, confirmed that *Phytophthora nicotianae* is the causative agent of heart rot in pineapple in the municipality of Isla, Veracruz, Mexico.

~~~~~ Finaliza la versión en Inglés ~~~~~

- Coppens, G., Leal, F., Duval, M. F. Germplasm resources of pineapple. 1997. Hort.Rev., 21:133-175.
- Doyle, J. J. and Doyle J. L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.
- Duniway, J. M. 1983. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases. p. 175-187 In: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao (eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Elliott, C. G. 1989. Some aspects of nitrogen nutrition and reproduction in *Phytophthora*. Mycol. Res. 92 (1): 34-44
- Erwin, D and Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathol. Soc., MN., p. 9-14
- Espinosa, R. G. and Adam, A. V. 1972. Major diseases of pineapple in Oaxaca, México, and their control. FAO Plant Protect. Bull. 20 (4): 79-87
- FAOSTAT, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultado Enero 2013. <http://faostat.fao.org>
- Fold N. and Gough K. V. 2008. From smallholders to transnationals: The impact of changing consumer preferences in the EU on Ghana's pineapple sector. Geoforum. 39 (5): 1687-1697
- Galiana, E., Rivière, M.-P., Pagnotta, S., Baudouin, E., Panabières, F., Gounon, P., and Boudier, L. 2005. Plant-induced cell death in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. Cellular Microbiol. 7 (9), 1365-1378
- Galleghy, E. M. and Hong, C. 2008. Identifying species by morphology and DNA fingerprints. The American Phytopathol. Soc. St. Paul MN. U.S.A. 108 p.
- Hassan, A., Othman, Z., and Siriphanich, J. 2011. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) p. 194-212 In: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Vol. 4 Mangosteen to white sopote. Elhadi M. Yahia (ed.) Woodhead Publishing. UK.
- Jeffers, S. N. and Martin, S. B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Dis. 70:1038-1043.
- Joy P. P. and Sindhu G. 2012. Diseases of pineapple (*Ananas comosus*): Pathogen, symptoms, infection, spread & management. Consultado Agosto 2013. <http://www.kau.edu/prsvkm/Docs/DiseasesofPineapple.pdf>

- Jung, T. and Blaschke, M. 2004. *Phytophthora* root and collar of alders in Bavaria: distribution, modes of spread and possible management strategies. *Plan Pathol.* 53: 193-208
- Kaneshiro, W. S., Burger, M., Vine, B., de Silva, A. S. and Alvarez, M. 2008. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* from a bacterial heart rot of pineapple outbreak in Hawaii. 2008. *Plant Dis.*, 92 (10): 1444-1450.
- Mircetich S. M., and Browne G. T. 1987. *Phytophthora* root and crown rot of deciduous fruit trees: Progress and problems in etiology, epidemiology and control. *Commemorative Symp.* 111 p.
- Morgan, T., and Thompson, T. 2000. Del Monte mixes and matches Costa Rican products. *Americafruit 3*: 45-47
- NCBI. 2012. National Center for Biotechnology Information. Gen Bank. Consultado Julio 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Ochse, J. J., Soule, M. J., JR., Dijkman, M. J. y Wehlburg, C.. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Editorial Limusa – Willey S. A., México, D. F. pp. 639-643
- Peckham G. D., Kaneshiro, W. S., Luu V., Berestecky, J. M., and Alvarez A. M.. 2010. Specificity of monoclonal antibodies to strains of *dickeya* sp. that cause bacterial heart rot of pineapple. *Hybridoma* 29(5): 383-389.
- Py, C. and Tisseau, M.. 1969. La piña tropical. Ed. Blumé. Barcelona, España. 278 p
- Rebolledo, M. A., Del Ángel P. A. L., Rebolledo, M. L. y Becerril, R. A. E., Uriza, A. D. 2006. Rendimiento y calidad de fruto de cultivares de piña en densidades de plantación. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 29 (1): 55-62
- Rebolledo, M. A., Uriza, A.D.E., Pérez, A. del A., Rebolledo, L. M. y Zetina, L. R.. 2011. La piña y su cultivo en México: Cayena Lisa y MD2. Campo Experimental Cotaxtla, Veracruz, México. Libro Técnico No. 27 306 p.
- Rebolledo, M. L., Uriza, A.D.E., Rodríguez, J. G. y Rebolledo, M. A. 1998. Tecnología para la producción de piña en México. Libro técnico No. 20. SAGARPA. INIFAP. CIR-GOC. Campo Exptl. Papaloapan. Veracruz, México 159 p.
- Rodríguez, Y., Mosqueda, M., Companioni, B., Arzola, M., Borrás, O., Pérez, M. C., Lorenzo, J. C., and Santos, R. 2002. Bioassay for *in vitro* differentiation of pineapple cultivar resistance levels to heart rot disease. *In vitro Cell. Dev. Boil.-Plant* 38:613-616.
- SIAP, 2013. Servicio de Información Agroalimentario y Pesquero. Consultado Enero 2013. <http://www.siap.gob.mx>
- White, T. J., Lee, B. S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315 – 322. In: Innis, M. A., Gelfand, D. A., Sninsky, J. J., White, T. J. (eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, CA, U.S.A.
- Williams, D. D. F., and Fleisch H. 1992. Historical review of pineapple breeding in Hawaii. *Acta Horticulturae.* 334: 67-76