



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas

Conservación y Manejo de Recursos Naturales

BOTRYOSPHERIACEAE ASOCIADAS AL CULTIVO DE
AGUACATE (*Persea americana*, Miller).

Tesis

**Como requisito obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas, en
el área de manejo y conservación de recursos naturales**

Presenta:

M.C. Juan Mendoza Churape

Directora:

Dra. Margarita Vargas Sandoval

Co-directora:

Dra. Tania Raymundo Ojeda

Morelia, Mich. Octubre, 2025



“Todo lo que te viniere a la mano para hacer, hazlo según tus fuerzas; porque en el reino de los muertos, adonde vas, no hay trabajo, ni proyectos, ni ciencia, ni sabiduría.”

Eclesiastés 9:10

Dedicatoria

*Con mucho respeto y cariño esta tesis es en memoria de la †Dra. Ma. Blanca Nieves
Lara Chávez, gracias infinitas por tu apoyo, gracias infinitas por darme ese amor que
solo una madre le puede dar a un hijo*

*Para el †profesor Churape, a quien siempre llevo en mi mente y en mi corazón a quién
con orgullo siempre llame papá, gracias por forjar lo que soy*

Juan Churape.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca otorgada para llevar a cabo este proyecto de tesis.

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, le agradezco por el respaldo institucional brindado durante mis estudios de doctorado, así como por el apoyo para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco sinceramente a mi asesora la Dra. Ma. Blanca Nieves Lara Chávez, haber depositado en mí su confianza y la oportunidad de desarrollar mi vida profesional y académica bajo su dirección, así como apoyarme con todos los recursos necesarios para concluir esta etapa tan importante en mi vida.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Ricardo Valenzuela Garza, Dr. Patricio Apaez Barrios y Dr. Rodolfo Sánchez Pérez, por sus contribuciones en el desarrollo de este proyecto y por haberme asesorado con dudas puntuales.

A la Dra. Margarita Vargas Sandoval por adoptarme académicamente y fungir como mi directora de tesis, por todo su apoyo y amistad, durante bastantes años, por ser más que mi profesora una amiga a quién admiro por su calidad moral, por ser humanista y luchar por sus estudiantes.

A la Dra. Tania Raymundo Ojeda, por todo su apoyo profesional, su amistad, por inspirarme y darme alientos a no rendirme en el mundo de la investigación, por ser ejemplo de trabajo, dedicación y fortaleza, una mujer a quien admiro y respeto.

Especialmente a mi madre María de Jesús Churape, no tengo palabras para expresar el agradecimiento que tengo hacia ella, no solo tuve la dicha de ser su hijo, sino también de poder compartir tantas cosas juntos, es mi fuerza, mi lugar seguro, quien me ha demostrado el verdadero significado de lo que todos llamamos amor.

A mis familiares y amigos, quienes han creído en mí y a quienes no, principalmente porque gracias a ello me di cuenta de quien soy y de la capacidad extraordinaria que tengo de fortaleza, carácter y astucia.

Por último pero no menos importante a mi hermana, por siempre estar para mí, por el cariño y apoyo que siempre ha mostrado por mi bienestar, a Giovanni U. V. P., por acompañarme en mi camino, por contagiarme de su alegría y cariño, por seguirme en mis locuras y por siempre sacarme una sonrisa en mis peores momentos, gracias!

Índice

Resumen general	5
General Summary.....	8
I.- Introducción general	11
II.- Justificación	17
III.- Planteamiento de Hipótesis.....	19
IV.- Objetivo general	19
V.- Resultados.....	20
Bibliografía.....	21
Capítulo I.....	24
Botryosphaeriaceae en el cultivo de aguacate	24
Capítulo II	35
First report of <i>Trametes hirsuta</i> causing white rot in avocado: Epidemiological basis of cultivated trees in the state of Michoacán, México	35
Capítulo III.....	54
Pathogenicity of <i>Neofusicoccum parvum</i> (Botryosphaeriaceae), on avocado fruits (<i>Persea americana</i> Mill) in the most important productive region of Mexico	54
DISCUSIÓN GENERAL	78
Bibliografía.....	82
Anexos.....	84
Hongos microscópicos un enemigo silencioso bajo tus pies	84

Resumen general

El cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill), representa uno de los pilares productivos más relevantes a nivel mundial, no solo por su valor económico, sino también por la trascendencia que posee en términos de manejo de recursos naturales (deforestación), y sostenibilidad agroecológica. En regiones como Michoacán, México, considerado el principal productor internacional, la expansión de este frutal ha generado oportunidades de desarrollo económico, pero también retos vinculados con la conservación de suelos, el uso racional del agua, la biodiversidad y la resiliencia de los agroecosistemas frente a plagas y enfermedades emergentes. Por ello, es imprescindible comprender el cultivo de aguacate desde un enfoque integral que vincule la productividad con la preservación ambiental, de manera que se logre un equilibrio entre la rentabilidad y la conservación de los recursos naturales.

En este contexto, en el primer capítulo realizamos una revisión bibliográfica sobre el manejo sustentable del cultivo donde encontramos que ello implica reconocer que la presión productiva ha favorecido la aparición y dispersión de nuevos fitopatógenos, los cuales amenazan directamente la estabilidad del sistema agrícola. La identificación precisa de estos organismos, particularmente hongos fitopatógenos, es un paso crítico para el diseño de estrategias de manejo integrado para el control de enfermedades. La caracterización morfológica, aunque tradicionalmente empleada, presenta limitaciones debido a la plasticidad fenotípica de muchos hongos. No obstante, es una herramienta inicial fundamental para observar rasgos diagnósticos como el tipo de esporas, estructuras reproductivas, pigmentación y crecimiento en medios de cultivo. Esta aproximación, al complementarse con técnicas moleculares, permite una identificación más robusta y confiable.

Las herramientas moleculares han revolucionado el campo de la fitopatología, ya que ofrecen la posibilidad de distinguir especies crípticas y revelar relaciones filogenéticas dentro de familias complejas, como lo es la familia Botryosphaeriaceae, que incluyen agentes responsables de canchros, pudriciones y muerte regresiva en aguacate y otros cultivos leñosos. Marcadores como ITS, LSU, *tefl-α* y *tub2*, y técnicas filogenéticas son esenciales para

esclarecer la diversidad de especies presentes en un agroecosistema y para asociar de manera confiable a los fitopatógenos con los síntomas observados en campo. Este nivel de precisión es indispensable, ya que permite diferenciar entre organismos saprófitos, oportunistas, endófitos latentes y verdaderos necrotróficos, lo cual tiene implicaciones directas en el manejo sanitario de los huertos.

Con ayuda de identificación taxonómica y molecular, en el segundo capítulo identificamos una especie antes no reportada como fitopatógeno (*Trametes hirsuta*), asociada al cultivo de aguacate, junto con la caracterización patogénica que constituye un eje central en la evaluación del riesgo que representan este tipo de fitopatógenos para el cultivo. Ensayos de patogenicidad en frutos, ramas, troncos y hojas bajo condiciones controladas permiten confirmar la capacidad del hongo de inducir síntomas, para cumplir con los postulados de Koch, y al mismo tiempo, establecer diferencias en agresividad entre cepas o especies. Estos estudios no solo aportan conocimiento básico sobre la biología y el ciclo de vida de los patógenos, sino que también generan información práctica para definir niveles de amenaza, priorizar especies en programas de manejo y orientar la selección de agentes de control biológico o químico.

La integración de estas aproximaciones, morfología, biología molecular y pruebas de patogenicidad, constituye la base para el desarrollo de estrategias de control eficaces y sustentables. Como se trabajó en el capítulo III, donde se caracterizó molecular y patogénicamente cepas de *Neofusicoccum parvum*. Este aporte expande, el conocimiento sobre la diversidad de especies detallado y la variabilidad genética, así como la agresividad de un fitopatógeno permite anticipar posibles fallas en el control químico, diseñar protocolos de monitoreo específicos y promover el uso de prácticas culturales que reduzcan la incidencia de la enfermedad. Así mismo, la identificación temprana de nuevos fitopatógenos asociados al aguacate contribuye a la implementación de medidas preventivas que limitan su dispersión hacia otras regiones productoras, para evitar pérdidas económicas y garantizar la inocuidad del fruto para mercados internacionales.

En conclusión, la importancia del cultivo de aguacate trasciende lo productivo, ya que se sitúa en el cruce entre el manejo de recursos naturales y la fitopatología moderna. La intensificación de este sistema agrícola demanda un equilibrio entre la rentabilidad y la

conservación ambiental, donde la vigilancia fitosanitaria se convierte en un elemento estratégico. La identificación morfológica y molecular de los fitopatógenos, junto con la caracterización de su patogenicidad, no solo fortalece el conocimiento científico, sino que también constituye una herramienta indispensable para la toma de decisiones en programas de manejo integrado de enfermedades. De este modo, se sientan las bases para un cultivo sostenible, resiliente y competitivo frente a los retos ambientales y fitosanitarios del siglo XXI.

Palabras clave: Marcadores moleculares (ITS, *tef1- α* , *tub2*, LSU), Diversidad fúngica, Necrotróficos, Patogenicidad, Pudrición.

General Summary

Avocado cultivation (*Persea americana* Mill) represents one of the most important productive pillars worldwide, not only for its economic value but also for its importance in terms of natural resource management (deforestation) and agroecological sustainability. In regions such as Michoacán, México, considered the main international producer, the expansion of this fruit crop has generated opportunities for economic development, but also challenges related to soil conservation, rational water use, biodiversity, and the resilience of agroecosystems to emerging pests and diseases. Therefore, it is essential to understand avocado cultivation from a comprehensive perspective that links productivity with environmental preservation, thus achieving a balance between profitability and the conservation of natural resources.

In this context, in the first chapter, we conduct a literature review on sustainable crop management, where we find that this implies recognizing that production pressure has favored the emergence and spread of new phytopathogens, which directly threaten the stability of the agricultural system. The accurate identification of these organisms, particularly plant pathogenic fungi, is a critical step in designing integrated disease management strategies. Morphological characterization, although traditionally employed, has limitations due to the phenotypic plasticity of many fungi. However, it is a fundamental initial tool for observing diagnostic traits such as spore type, reproductive structures, pigmentation, and growth in culture media. This approach, when complemented by molecular techniques, allows for more robust and reliable identification.

Molecular tools have revolutionized the field of plant pathology, offering the ability to distinguish cryptic species and reveal phylogenetic relationships within complex families, such as the Botryosphaeriaceae family, which includes agents responsible for cankers, rots, and dieback in avocado and other woody crops. Markers such as ITS, LSU, *tef1- α* , and *tub2*, and phylogenetic techniques, are essential for elucidating the diversity of species present in an agroecosystem and for reliably associating plant pathogens with symptoms observed in the field. This level of precision is essential because it allows for differentiating between saprophytic, opportunistic, latent endophytic, and true necrotrophic organisms, which has direct implications for orchard health management. With the help of taxonomic and

molecular identification, in the second chapter we identify a species previously unreported as a phytopathogen (*Trametes hirsuta*), associated with avocado crops, along with the pathogenic characterization that constitutes a central axis in the evaluation of the risk that this type of phytopathogen represents for the crop. Pathogenicity assays on fruits, branches, trunks, and leaves under controlled conditions confirm the fungus' ability to induce symptoms, fulfilling Koch's postulates, and at the same time, establish differences in aggressiveness between strains or species. These studies not only provide basic knowledge about the biology and life cycle of pathogens, but also generate practical information to define threat levels, prioritize species in management programs, and guide the selection of biological or chemical control agents.

The integration of these approaches morphology, molecular biology, and pathogenicity testing forms the basis for the development of effective and sustainable control strategies. As discussed in Chapter III, strains of *Neofusicoccum parvum* were molecularly and pathogenically characterized. This contribution expands our knowledge of the detailed species diversity and genetic variability, as well as the aggressiveness of a phytopathogen, allowing us to anticipate potential failures in chemical control, design specific monitoring protocols, and promote the use of cultural practices that reduce disease incidence. Likewise, the early identification of new phytopathogens associated with avocado contributes to the implementation of preventive measures that limit their spread to other producing regions, thus avoiding economic losses and ensuring the safety of the fruit for international markets.

In conclusion, the importance of avocado cultivation transcends production, as it lies at the intersection of natural resource management and modern phytosanitary research. The intensification of this agricultural system demands a balance between profitability and environmental conservation, where phytosanitary surveillance becomes a strategic element. The morphological and molecular identification of plant pathogens, along with the characterization of their pathogenicity, not only strengthens scientific knowledge but also constitutes an indispensable tool for decision-making in integrated disease management programs. This lays the foundation for sustainable, resilient, and competitive crop cultivation in the face of the environmental and phytosanitary challenges of the 21st century.

Keywords: Molecular markers (ITS, *tef1- α* , *tub2*, LSU), Fungal diversity, Necrotrophic pathogens, Pathogenicity, Rot.

I.- Introducción general

Los hongos constituyen todo un reino son pieza clave en casi todos los ecosistemas de la biosfera, cumplen diferentes actividades biológicas desde recicladores de materia a simbiosis con plantas y en algunos casos como parásitos de otros organismos. Se estima que son mega diversos y existen alrededor de dos millones de especies o más, aunque más del 90 % sigue totalmente desconocido (Niskanen, 2023). Esto debido a que las actuales herramientas de identificación molecular mediante la secuenciación masiva indican que pudieran existir mas de 13 millones de especies fúngicas (Hyde, 2022).

Desde el ámbito industrial y biotecnológico, los hongos microscópicos han sido utilizados como fuente productora de compuestos principalmente metabólicos con valor comercial muy considerable. Los hongos filamentosos son productores eficaces de enzimas, antibióticos y otros metabolitos utilizados en el procesamiento de alimentos, como espesantes o estabilizadores así como productos farmacéuticos y biocombustibles. Entre los ejemplos más conocidos se encuentran la producción de antibióticos como la penicilina a partir de *Penicillium chrysogenum* y la obtención de enzimas como la celulasa y amilasas para la industria alimentaria (Meyer et al. 2020)

También cumplen un papel destacado en la alimentación humana, no solo por su consumo directo. La fermentación de pan, cerveza, vino y quesos involucra especies como *Saccharomyces cerevisiae* y diversos mohos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Varga et al., 2019).

En la investigación científica, los hongos han servido como modelos experimentales para entender procesos biológicos fundamentales. *Saccharomyces cerevisiae* ha sido clave en estudios de genética y biología molecular, siendo el primer eucariota cuyo genoma fue secuenciado completamente (Goffeau et al., 1996).

Dentro del extenso mundo de los hongos existen un grupo microscópico donde se incluyen organismos fitopatógenos que desempeñan un papel determinante en la sanidad vegetal y en la producción agrícola mundial tanto por ser beneficiosos o estar asociados a enfermedades en las plantas. Su capacidad para alimentarse del tejido vegetal al desarrollar su ciclo de vida los coloca como uno de los principales factores que limitan la producción agrícola y forestal, las pérdidas económicas anuales por enfermedades en plantas se estiman alrededor de 15 %

a nivel mundial lo que se puede entender en pérdidas de millones de dólares, de las cuales el 80 % de estas es ocasionada por hongos fitopatógenos (Peng, 2021).

De acuerdo con la biología de los hongos microscópicos al desarrollar su ciclo reproductivo con mecanismos sofisticados y complejos enzimáticos pueden hacerse presentes en todas las etapas fenológicas de su hospedero, así como en post cosecha, en este proceso tienen la capacidad de destruir no solo los cultivos sino la cosecha, esto implica una proporción considerable de un 30 % del producto final donde siguen aun con su actividad como descomponedor (Fisher et al. 2012).

Los cultivos de importancia agrícola, que generalmente son seleccionados de manera artificial y mejorados genéticamente por el hombre, presentan una alta susceptibilidad por las enfermedades de origen fúngico. En el caso de algunas Poacias como el trigo (Chai et al. 2022), se estima que casi en su totalidad la superficie global destinada a la producción esta infectada con al menos algún tipo de enfermedad de las más comunes que atacan el cultivo lo que origina el aumento del precio de producción, esto genera riesgos en el ámbito de la seguridad alimentaria entre toda la población humana ya que este grano, así como sus subproductos forman parte básica de la dieta alimenticia a nivel mundial.

Uno de los principales factores que favorecen la diseminación de las enfermedades ocasionadas por hongos microscópicos no solo son meramente ambientales (agua, aire, suelo y clima), sino dadas por el hombre ya que debido a la alta demanda de alimentos se requieren grandes extensiones dedicadas a la producción del mismo lo que conocemos como monocultivo (Funk y Thines, 2016), en algunos agroecosistemas los fitopatógenos causan grandes pérdidas y las plantas en muchos de los casos no se pueden remplazar.

La manera mas eficaz de combatir este tipo de enfermedades es mediante un buen diagnóstico rápido y eficaz en el cual se puede implementar mediante el uso de técnicas modernas y herramientas moleculares, para la identificación de los diferentes fitopatógenos lo que resultara en menos pérdidas económicas (Sharma, 2024). Por su parte un factor que agrava más la situación es el inminente cambio climático, las lluvias excesivas y la drástica fluctuación de temperatura, tal hecho ha modificado patrones epidemiológicos y aumentado la aparición de especies de hongos microscopios donde antes no existían (Waheed, 2023).

El cambio climático y el cambio de uso de suelo está transformando las interacciones entre plantas y hongos, lo que provoca una mayor agresividad de los patógenos y su expansión a nuevas áreas geográficas y otras especies vegetales antes no parasitadas (Waheed, 2023). En conjunto, la evidencia científica confirma que los hongos fitopatógenos microscópicos representan una amenaza constante y creciente para la agricultura global. Su control requiere estrategias integrales que combinen el diagnóstico temprano, el manejo cultural, el uso de variedades resistentes y el control biológico, con el objetivo de garantizar la producción de alimentos y preservar la seguridad alimentaria mundial.

Las enfermedades en plantas leñosas suelen ser muy comunes y pueden llegar a ser devastadoras, incluyen síntomas generalizados en los hospederos como muerte regresiva de ramas, canchales e infecciones en el sistema radicular. Los principales fitopatógenos responsables de estas enfermedades pertenecen al Phylum Ascomycota, a un amplio grupo de hongos de la familia Botryosphaeriaceae, fitopatógenos oportunistas que se presentan como saprófitos, parásitos o endófitos (Slippers y Wingfield 2007; Phillips et al., 2013). Actualmente, se tienen identificadas más de 2000 especies que están vinculados a esta familia, entre ellos sus estados teleomorfo y anamorfo de los cuales *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Sphaeropsis* contienen la mayoría de las especies (Bega et al. 1978; Brown y Britton 1986; Arcx Michailides 1991; Swart y Wingfield 1991; Crous et al., 2006).

Estas especies de hongos fitopatógenos tienen un amplio rango de hospedadores y pueden parasitar árboles tanto nativos como especies introducidas para fines agrícolas (Slippers y Wingfield 2007; Sakalidis et al., 2011). La identificación por medio de herramientas moleculares ha descubierto que a nivel genético los fitopatógenos tanto de Eucalipto (*Eucalyptus*) en una zona nativa en Australia y las encontradas en especies vegetales exóticas no presentaron diferencias, las cuales fueron parasitadas por un hongo microscópico llamado *Neofusicoccum australe* (Burgess et al., 2006). Por lo tanto podemos deducir que las especies vegetales oriundas del ecosistema y las introducidas pueden ser parasitadas por especies de esta familia de hongos tan importante (Botryosphaeriaceae), y que a su vez las especies nativas de áreas circunvecinas (Burgess et al., 2006; Slippers y Wingfield 2007; Sakalidis et al., 2011).

Algunos miembros de la familia Botryosphaeriaceae como *Lasiodiplodia theobromae* fue aislada e identificada en sur america en la zona occidente, de manera muy notoria por su severidad y virulencia ya que causo pérdidas económicas considerables en cultivos de interés agrícola como: *Vitis vinefera*, *Mangifera indica*, *Vaccinium corymbosum* y *Persea americana*, además se reportó una incidencia en campo de un 82 % de este fitopatógeno (Rodríguez et al., 2021). Sin embargo, Delgado et. al. (2016) mencionan que en Uruguay las infecciones causadas por Botryosphaeriales, provocaron pérdidas de plantaciones de manzana hasta del 30 % en los huertos comerciales, Menge y Ploetz, (2003) han señalado que *B. dothidea* es el fitopatógeno más común reportado en Chile, México, Sudáfrica y los Estados Unidos. Otras especies previamente reportadas son *Diplodia mutila* (Chen et al., 2014) y *Dothiorella iberica* en EE. UU. (McDonald y Eskalen, 2011); *Neofusicoccum* spp. y *Lasiodiplodia theobromae* en Italia (Garibaldi et al., 2012), (Guarnaccia et. al., 2016) y España (Arjona-Girona et al., 2019; Zea-Bonilla et al., 2007), en Chile (Valencia et al., 2019), Colombia (Ramírez-Gil y Peterson, 2019), China (Qiu et al., 2020), Kenia (Wanjiku et al., 2020) y Nigeria (Onaebi et al., 2019) por mencionar los mas importantes.

Los hongos de la familia Botryosphaeriaceae se han estudiado en México en diferentes cultivos, asociado a pudriciones en frutos hasta canchales en troncos y ramas y muerte regresiva y pudriciones radiculares (García et al. 2021), los generos de esta importante familia como: *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* y *Neoscytalidium* tienen la capacidad de infectar diversos cultivos hortícolas y a pesar de tener esta capacidad no comparten las mismas cualidades entre la severidad y virulencia, esto en funcion de diversos factores como lo es el genero de fitopatogeno, el hospedero y el clima, asi como el tipo de organo vegetal que vaya a colonizar, algo que destaca de este grupo de hongos es que pueden desarrollarse infectivamente en cualquier organo de la planta, desde brotes tiernos, paniculas, ramas y troncos leñosos y semi leñosos hasta el sistema radicular, lo que explica la amplitud de órganos vegetales afectados en distintos contextos agrícolas en el campo mexicano.

En el cultivo de aguacate (*Persea americana*) var. Hass principalmente en el estado de Michoacán, Mexico. Una de las zonas con mayor extension de este cultivo se han reportado

estos fitopatogenos causantes de infecciones en general en todo el arbol en frutos causante del sintoma conocido como “black spots”, (Molina-Gayosso et al., 2012)

En vid (*Vitis vinifera*) en plantaciones en Baja California y el estado de Sonora, se han identificado varias especies de dos miembros de la familia Botryosphaeriaceae; *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum* asociadas a tejido leñoso de ramas y troncos donde se detectaron principalmente causantes de la enfermedad conocida como grapevine trunk diseases. Recientemente se ha identificado estas y otras especies en el cultivo y relativamente son poco estudiados y se les ha denominado como primer reporte para México (Rangel-Montoya et al., 2021). Además, en estudios posteriores, “los aislados de *Neofusicoccum parvum* fueron los más virulentos” sobre tejidos leñosos (Rangel-Montoya et al., 2024)

Otro primer reporte para Mexico fue *Neoscytalidium dimidiatum* causante de muerte descendente en un arbol urbano, exotico muy popular en el pais que generalmente se puede encontrar en parques, jardines y la via publica mejor conocido como “Ficus o trueno” (*Ficus benjamina*), el trabajo se llevo a cabo en Hermosillo, Sonora Mexico.

En arboles de mango (*Mangifera indica*) en el estado de Campeche, *Lasiodiplodia theobromae* y *L. pseudotheobromae* han sido reportadas afectando principalmente ramas y troncos con síntomas de muerte descendente y canchros tambien conocida como gomosis. El genero *L. theobromae* se ha reportado en México causante de diversas enfermedades en múltiples cultivos principalmente frutales, con registros de infección en ramas productivas y madera estructural en climas cálidos y subhúmedos (Picos-Muñoz et al., 2015).

En papaya (*Carica papaya*) de Nayarit y Veracruz, *L. theobromae* se ha aislado de frutos con pudriciones en poscosecha, especialmente en almacenamiento a temperatura ambiente (Picos-Muñoz et al., 2015). En cítricos (*Citrus* spp.) cultivados en el estado de Veracruz, *Neoscytalidium dimidiatum* se ha asociado con ramas y troncos que presentan necrosis cortical y decaimiento progresivo (muerte descendente), bajo condiciones de alta humedad relativa (Picos-Muñoz et al., 2015).

El objetivo principal de esta tesis fue aislar, identificar y caracterizar patogenicamente mediante tecnicas moleculares y fitopatologicas especies de la familia Botryosphaeriaceae asociados a enfermedades en el cultivo de aguacate en el estado de Michoacan, Mexico. Es

la zona conocida como franja aguacatera, que destaca por su extensa superficie, gran producción y exportación a nivel nacional e internacional. El estudio se llevó a cabo en huertos comerciales de municipios con importancia en producción y superficie cultivada, se tomaron en cuenta también las condiciones agroecológicas distintas entre ellos como: altitud, precipitación y clima. La franja aguacatera se localiza principalmente en la Meseta Purépecha y sierras adyacentes, con altitudes que oscilan entre 1 600 y 2 400 m s. n. m., lo que permite un clima templado subhúmedo apto para el cultivo de ‘Hass’ y facilita escalonar floraciones y cosechas (Denvir et al., 2023). Los suelos predominantes son Andosoles derivados de cenizas volcánicas, caracterizados por alta capacidad de retención de agua y buena fertilidad, aunque vulnerables a la degradación bajo manejo intensivo (Sánchez-Mendoza et al., 2024). La expansión del aguacate se ha asociado a deforestación y fragmentación de bosques templados. Denvir et al. (2023) proyectan que “el área destinada a aguacate podría aumentar un 117 % en Michoacán para 2050.

La tesis está conformada por una introducción general, tres capítulos y una discusión general de todos los resultados obtenidos en el presente estudio. El primer capítulo está publicado en la revista Mexicana de Ciencias Agrícolas bajo el título *Botryosphaeriaceae* en el cultivo de aguacate y consistió en una revisión de los estudios posteriores bibliográficamente fue conocer el estatus epidemiológico y de identificación de especies que se ha llevado, con respecto a miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* de importancia agrícola en México.

El escrito se elaboró en el año 2023 con base en reportes de investigación científica en el campo de fitopatología de reportes epidemiológicos de la enfermedad conocida como cancro y su síntoma característico de muerte descendente. La enfermedad está distribuida en toda la región productora de aguacate y reportada en varios cultivos, y está extendida a lo largo del mundo y coinciden que los miembros de *Botryosphaeriaceae*, son fitopatógenos severos y virulentos que generan grandes pérdidas económicas y biológicas en el caso de especies nativas. En México en el cultivo de aguacate este grupo de fitopatógenos fue reportado en la década de 1980 (Coria, 1985), con las condiciones favorables para que se desarrolle la enfermedad coloniza la raíz y base de la corona, invade haces vasculares y toma los nutrientes para su desarrollo, la enfermedad se desencadena por una condición de estrés y es influenciada por la temperatura, precipitación, humedad, pH y textura del suelo. En campo,

la efectividad biológica de las moléculas, para su control, puede ser una alternativa factible, pero resultan más efectivas las prácticas preventivas y culturales.

Dada la situación fitosanitaria que implica la producción de aguacate es necesario implementar alternativas de manejo integrado, sin antes conocer los fitopatógenos asociados, esto con técnicas moleculares por la plasticidad genética y la similitud morfológica que presentan los diferentes géneros y especies. Para esto realice muestreos en diferentes localidades y municipios de importancia tanto es superficie cultivada como en producción, así mismo con diferentes condiciones agroclimatológicas, mediante muestreo dirigidos a los árboles con síntomas de enfermedad se recolecto el tejido infectado, se aisló purifico, identifico patogénica, morfológica y molecularmente los diferentes géneros y especies asociadas a los árboles con síntomas de la infección en diferentes órganos de esta. especies". En el segundo capítulo, identifique una especie de hongo como primer reporte de fitopatógeno para México, asociada a la pudrición de ramas de aguacate debido a su alta incidencia, severidad y virulencia en los distintos huertos comerciales en los que se realizaron los diferentes muestreos de árboles enfermos y con muerte de ramas, en la zona productora de este frutal más importante del mundo. Para ello evalué la patogenicidad de las cepas (severidad y virulencia), y lleve a cabo la inoculación de tejido sano para cumplir con los postuladas de koch y también caracterizar los síntomas y signos expresados por el fitopatógeno en tejido sano, posteriormente también lleve a cabo una identificación molecular mediante técnicas de PCR, con diferentes genes específicos para su correcta identificación con ayuda también de análisis filogenéticos.

II.- Justificación

El aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) constituye uno de los cultivos de mayor relevancia económica en México y a nivel mundial, no solo por su aporte a la seguridad alimentaria y al comercio internacional, sino también por la creciente demanda en mercados de alto valor. Sin embargo, su producción enfrenta una serie de problemas fitosanitarios que impactan tanto en campo como en postcosecha. Entre ellos, las enfermedades causadas por hongos de la familia Botryosphaeriaceae han adquirido un papel central, siendo responsables de canchros, decaimiento de ramas, muerte regresiva y pudriciones de fruto, particularmente el denominado “stem rot” (Valencia et al., 2019). La identificación precisa de estas especies

resulta fundamental, dado que muchas de ellas se comportan como endófitos latentes capaces de expresarse bajo condiciones de estrés o en etapas postcosecha, lo que complica su manejo (Avenot et al., 2023).

El diagnóstico basado únicamente en caracteres morfológicos ha demostrado ser limitado debido a la gran plasticidad fenotípica y la existencia de especies crípticas dentro de la familia (Fiorenza et al., 2023). Por ello, en los últimos años se ha consolidado el uso de aproximaciones moleculares multilocus que combinan regiones como ITS, *tef1- α* , *tub2* y *rpb2*, lo cual permite una delimitación filogenética robusta de las especies implicadas en aguacate y otros frutales leñosos (Santillán-Mendoza et al., 2024). Estos métodos, además de incrementar la precisión taxonómica, sientan las bases para evaluar diferencias en patogenicidad, epidemiología y sensibilidad a fungicidas, información esencial para diseñar estrategias de control específicas.

La importancia de este enfoque integrador también radica en la detección temprana y en la vigilancia epidemiológica. Recientes avances, como la implementación de pruebas de qPCR, han demostrado ser capaces de detectar simultáneamente *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea* y el consorcio Botryosphaeriaceae en tejidos vegetales, suelos y material de propagación, incluso en fases asintomáticas (Romero-Cuadrado et al., 2024). Esta tecnología abre la posibilidad de establecer programas de monitoreo preventivo en huertas, viveros y empaques, reduciendo el riesgo de introducción y dispersión de patógenos.

En México las investigaciones recientes han confirmado la relevancia de especies como *Lasiodiplodia theobromae* y *Neofusicoccum parvum* en ramas y frutos de aguacate en Michoacán, con evidencias tanto en postcosecha como en campo (Herrera-González et al., 2020). Estos hallazgos refuerzan la necesidad de aplicar herramientas de identificación molecular en huertas nacionales, no solo para caracterizar la diversidad local, sino también para diseñar estrategias de manejo fitosanitario alineadas con la realidad productiva del principal estado productor de aguacate.

En suma, la justificación de este estudio radica en que la identificación morfológica y molecular de Botryosphaeriaceae en *Persea americana* var. Hass no es únicamente un ejercicio taxonómico, sino una necesidad estratégica para vincular la investigación científica

con la sanidad agrícola y la sostenibilidad de la cadena productiva del aguacate en México y a nivel internacional.

III.- Planteamiento de Hipótesis

Las enfermedades causadas por especies de Botryosphaeriaceae en aguacate representan un problema complejo debido a su diversidad taxonómica, su capacidad de comportarse como endófitos latentes y su expresión patogénica bajo condiciones de estrés biótico o abiótico. La dificultad para diferenciarlas morfológicamente ha provocado diagnósticos ambiguos y estrategias de manejo poco específicas, lo que aumenta las pérdidas económicas en campo y postcosecha, por ello el presente trabajo de investigación se desarrolló a partir de estrategias de campo y laboratorio con dirección a analizar las diferentes especies asociadas a las infecciones en arboles de aguacate, a partir de los objetivos específicos planteados, se deriva las siguiente hipótesis que fue evaluada con base en los resultados obtenidos:

Hipótesis

Existen varias especies de Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo de aguacate, como endófitos y causantes de infecciones generalizadas en la planta.

IV.- Objetivo general

Determinar morfológica, patogénica y molecularmente especies de la familia Botryosphaeriaceae, asociadas al cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill var. Hass), para la identificación de las especies que están presentes en árboles de huertos de la franja aguacatera del estado de Michoacán, México, mediante la recolección de muestras en campo y su análisis taxonómico y molecular.

Objetivos específicos

1. Describir especies de la familia Botryosphaeriaceae presentes en el cultivo de aguacate, mediante caracteres morfológicos para su identificación taxonómica y su diversidad presente en la franja aguacatera del estado de Michoacán, México.
2. Desarrollar pruebas de patogenicidad en troncos, ramas y frutos de *Persea americana* Miller, para la identificación de los síntomas observados en campo, mediante la inoculación de las cepas en plantas sanas.
3. Identificar molecularmente especies de la familia Botryosphaeriaceae presentes en el cultivo de aguacate, (*Persea americana* Mill), mediante técnicas moleculares, para la identificación de la diversidad de especies y comprobación morfológica.

V.- Resultados

CAPÍTULO I. Botryosphaeriaceae en el cultivo de aguacate

CAPÍTULO II. First report of *Trametes hirsuta* causing white rot in avocado: Epidemiological basis of cultivated tress in the state of Michoacán, México

CAPÍTULO III. Pathogenicity of *Neofusicoccum parvum* (Botryosphaeriaceae), on avocado fruits (*Persea americana* Mill) in the most important productive region of Mexico

Bibliografía

- Arjona-Girona, I., Ruano-Rosa, D., & López-Herrera, C. J. (2019). Identification, pathogenicity and distribution of the causal agents of dieback in avocado orchards in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(1), <https://doi.org/10.5424/sjar/2019173-13561> e1003.
- Avenot, H. F., Vega, D., Arpaja, M. L., & Michailides, T. J. (2023). Prevalence, identity, pathogenicity, and infection dynamics of *Botryosphaeriaceae* causing, avocado branch canker in California. *Phytopathology*, 113(6), 1034-1047. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-21-0459-R>
- Chai, Y., Senay, S. D., & Horvath, D. (2022). Global distribution and risk assessment of wheat fungal diseases. *Frontiers in Plant Science*, 13, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1034600> 1034600.
- Fernández-Herrera, E., et al. (2017). *Neoscytalidium dimidiatum*: causal agent of dieback in *Ficus benjamina* L. in Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*.
- Fiorenza, A., Gusella, G., Vecchio, L., Aiello, D., & Polizzi, G. (2023). Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with canker and dieback of avocado (*Persea americana*) in Italy. *xtopathologia Mediterranea*, 62(1), 47-63. <https://doi.org/10.36253/phyto-1957>
- Fisher, M. C., et al. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem, bealth. *Nature*, 484(7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>

- Funk, S., & Thines, M. (2016). The role of pathogens in plant communities. *Microbiology Spectrum*, 4(6), FUNK-0013-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0013-2016>
- García, J. F., et al. (2021). Phylogenomics of plant-associated Botryosphaeriaceae species. *Frontiers in Microbiology*, 12, 652802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652802>
- Herrera-González, J. A., Bautista-Baños, S., Salazar-García, S., & Gutiérrez-Martínez, P. (2020). Situación actual del manejo poscosecha y de enfermedades fungosas del aguacate 'Hass' para exportación en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(7), 1647-1660. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2534>
- Molina-Gayosso, E., et al. (2012). First report of black spots on avocado fruit caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. *Plant Disease*, 96(2), <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0452> 287.
- Nizamani, M. M., et al. (2024). Fungal pathogens and global food security. *Science of The Total Environment*, 912, 164065. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164065>
- Peng, Y. (2021). Advances in understanding pathogenic mechanisms of plant pathogenic fungi. *Frontiers*, in <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663182> *Microbiology*, 12, 663182.
- Picos-Muñoz, P. A., et al. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* in Agricultural Crops in México: Taxonomy, Host, Diversity, and Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*.
- Rangel-Montoya, E. A., et al. (2021). Characterization of *Lasiodiplodia* species associated with grapevines in Mexico, *Phytopathologia Mediterranea*, 60(2), 237-251.

- Rangel-Montoya, E. A., et al. (2024). Enhancing epidemiological knowledge of Botryosphaeriaceae in Mexican vineyards, *Phytopathologia Mediterranea*.
- Romero-Cuadrado, L., García-Benavides, P., Villa-Tejedor, C., Abad-Campos, P., & Gramaje, D. (2024). Triplex, real-time qPCR for the simultaneous detection of *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea* and Botryosphaeriaceae in woody crops and environmental samples. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1435462. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1435462>
- Santillán-Mendoza, R., Estrella-Maldonado, H., Marín-Olarte, L., Matilde-Hernández, C., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., & Flores-de la Rosa, F. R. (2024). Phylogenetic, and pathogenic, evidence, reveals, novel host-pathogen interactions between *Lasioidiplodia* spp, and *Citrus latifolia* dieback disease in southern Mexico *Journal of Fungi*, 10(7), 484. <https://doi.org/10.3390/jof10070484>
- Sharma, G. (2024). Early detection of fungal plant, diseases using AI-based systems. *Current Research in Biotechnology*, 6, 100127. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2024.100127>
- Waheed, A. (2023). Climate change reshaping plant-fungal interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 214, 105440. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105440>

Capítulo I

Botryosphaeriaceae en el cultivo de aguacate

Publicado en *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 15(5),
e3745. <https://doi.org/10.29312/remexca.v15i5.3745>

Botryosphaeriaceae en el cultivo de aguacate

Juan Mendoza-Churape^{1,2}
Margarita Vargas Sandoval³
Ma. Blanca Nieves Lara-Chávez^{2,§}

1 Posgrado en Ciencias Biológicas-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (juan.churape@umich.mx).

2 Laboratorio de Fitopatología-Facultad de Agrobiología 'Presidente Juárez'-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60170.

3 Facultad de Biología-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Francisco J. Mujica s/n, Ciudad Universitaria, Edificio B-1, Morelia, Michoacán, México. CP. 58060. (margarita.vargas@umich.mx).

Autora para correspondencia: blanca.lara@umich.mx

HTML d

Resumen

El objetivo de la revisión bibliográfica fue conocer el estatus epidemiológico y de identificación de especies que se ha llevado, con respecto a miembros de la familia Botryosphaeriaceae de importancia agrícola. El escrito se elaboró en el año 2023 con base en reportes de investigación científica en el campo de fitopatología de reportes epidemiológicos de la enfermedad conocida como cancro y su síntoma característico de muerte descendente. La enfermedad está distribuida en toda la región productora de aguacate y reportada en varios cultivos, y está extendida a lo largo del mundo y coinciden que los miembros de Botryosphaeriaceae, son fitopatógenos severos y virulentos que generan grandes pérdidas económicas y biológicas en el caso de especies nativas. En México en el cultivo de aguacate este grupo de fitopatógenos fue reportado en la década de 1980 (Coria, 1985), con las condiciones favorables para que se desarrolle la enfermedad coloniza la raíz y base de la corona, invade haces vasculares y toma los nutrientes para su desarrollo, la enfermedad se desencadena por una condición de estrés y es influenciada por la temperatura, precipitación, humedad, pH y textura del suelo. En campo, la efectividad biológica de las moléculas, para su control, puede ser una alternativa factible, pero resultan más efectivas las prácticas preventivas y culturales. Dada la situación fitosanitaria que implica la producción de aguacate es necesario implementar alternativas de manejo integrado, sin antes conocer los fitopatógenos asociados, esto con técnicas moleculares por la plasticidad genética y la similitud morfológica que presentan.

Palabras clave:

cancro, control, enfermedad, secuencia, taxonomía.



License (open-access): Este es un artículo publicado en acceso abierto bajo una licencia **Creative Commons**

La familia Botryosphaeriaceae, se describe por primera vez en la década de 1820, con el género *Sphaeria* como miembro representativo (Crous *et al.*, 2006). El género *Botryosphaeria* como tal, fue establecido hasta 1863 y se describió como la mayoría de los Ascomycetes con estructuras características llamadas ascas de forma esféricas y ascas tunicadas y bitinucadas, se identificaron como saprófitos debido a que sus fructificaciones se presentaban solo sobre tejido muerto de plantas leñosas (Bega *et al.*, 1978; Brown y Britton, 1986; Von Arx, 1987; Michailides, 1991; Swart y Wingfield, 1991).

Hasta ahora los Botryosphaeriales están conformados por seis familias que son: Aplosporellaceae, Botryosphaeriaceae, Melanopsaceae, Phyllostictaceae, Planistromellaceae y Saccharataceae (Phillips *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021). La mayoría de los taxa de Botryosphaeriales están reportados como endófitos, esto quiere decir, que se encuentran dentro del hospedero en los tejidos sanos de las plantas en lapsos de tiempo indefinidos de acuerdo con el ciclo fenológico y la especie hospedera vegetal (Slippers *et al.*, 2007).

Especies importantes dentro de Botryosphaeria como: *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Phyllosticta*, *Pseudofusicoccum* y *Saccharata* incluyen endófitos bien caracterizados en distintos cultivos (Slippers y Winfield, 2007; Crous *et al.*, 2008; Crous *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021). Existen estudios detallados donde se mostraron la gran diversidad de estos hongos, también se incluyen dentro de un rango de plantas, especies con estilos de vida distintos como saprobios y fitopatógenos obligados, pero no menos importantes (Slippers y Wingfield, 2007).

Fisiología de Botryosphaeria

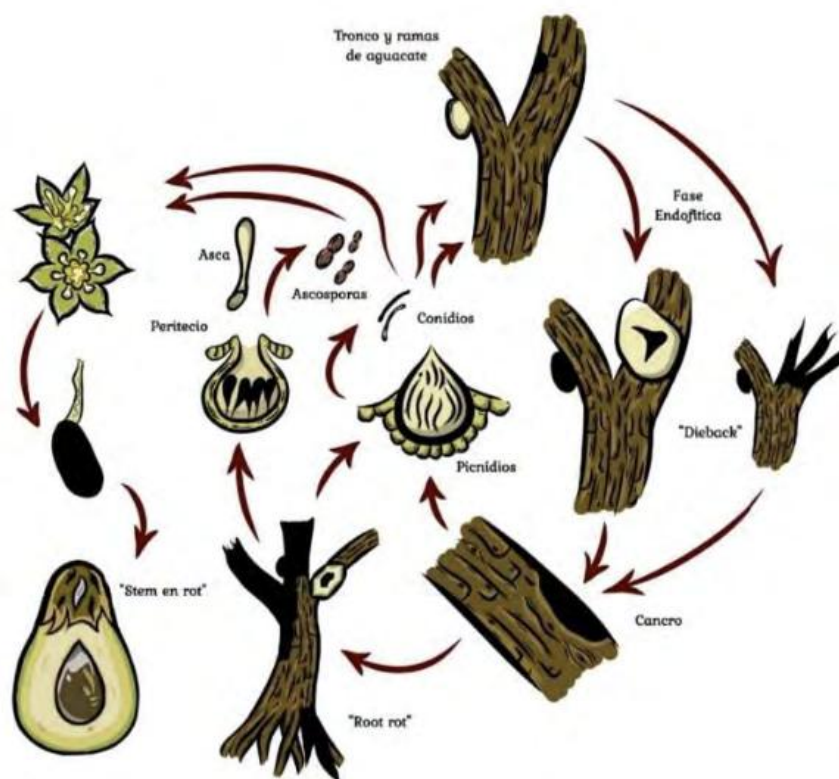
Las ascosporas y conidios de los Botryosphaeriales presentan una diversa morfología, pueden presentar pigmentación o ser hialinos, septados o aseptados y la presencia o ausencia de una vaina mucilaginosa los conidios pueden ser fusiforme a ovoide o elíptica. Los conidios hialinos y aseptados se convierten en uno o dos septados y algunas especies desarrollan una coloración marrón antes de la germinación como *Diplodia corticola*, *D. cupressi* y *D. mutila*, con conidios muy similares entre sí por pertenecer al mismo género (Phillips *et al.*, 2013). Los conidios de paredes gruesas y hialinos o marrones parecidos a diplodios también los podemos encontrar en la familia Botryosphaeriaceae.

Por último, las células más internas son de pared delgada y hialina. El ostiolo del picnidio es simple, circular y central. Las células conidiógenas son de aspecto hialino y se sitúan perpendicularmente a las paredes del picnidio, orientándose de esta manera hacia el centro de la cavidad. La melanina producida por estas estructuras se puede encontrar en especies fitopatógenas, así como en taxones de hábitos saprobios y esto contribuyó notablemente a la supervivencia en cuando las condiciones ambientales son adversas (Belozerskaya *et al.*, 2017). Esto significa que la producción de melanina tiene una mayor relación sobre los hongos fitopatógenos porque está directamente relacionado con la virulencia y la severidad (Nosanchuk y Casadevall, 2003; Belozerskaya *et al.*, 2017).

Ciclo de la enfermedad de familia Botryosphaeraceae

El ciclo de vida de la mayoría de los hongos fitopatógenos de la familia Botryosphaeraceae (Figura 1), comienza cuando los conidios o ascosporas tienen contacto con el hospedero; a través, de aberturas naturales o hechas artificialmente por daños mecánicos. Las aberturas naturales pueden ser lenticelas (estas son pequeñas estructuras que se encuentran en tallos, raíces y ramas que permiten el intercambio de gases) (Everett *et al.*, 2008) o incluso en las panículas en casos de 'podredumbre de rama o muerte descendente'. Las aberturas creadas artificialmente por daños mecánicos se pueden hacer accidentalmente al podar, injertar, cosechar, plantar u otras labores culturales, así como por granizadas incendios o insectos (Everett *et al.*, 1999).

Figura 1. Ciclo de patogénesis de hongos de la familia Botryosphaeriaceae, causantes de canchros en árboles de aguacate.



El ciclo de patogénesis de estos hongos se inicia cuando los conidios o las ascosporas infectan la planta a través de heridas o lenticelas, el hongo produce enzimas que atacan al cambium y albura, degradándolos para utilizarlos como nutrientes. Una vez colonizados los tejidos de la planta, se inicia la producción de conidios en los picnidios (peritecios: estructuras formadoras de esporas que emergen a través de la corteza infectada). Estos conidios son los responsables de la aparición de los ciclos secundarios de la enfermedad en otros órganos de la planta.

En los tejidos ya muertos, conjuntamente a la producción de conidios, se generan las estructuras de carácter sexual, que una vez maduras producen las ascosporas infectivas que dan lugar a nuevas infecciones primarias. El hongo sobrevive en los canchros y en las ramas y brotes infectados, así como en las hojas muertas del suelo.

La infección comienza con la germinación de conidios o ascosporas que al alimentarse del hospedero avanza la infección, esto puede darse también por la influencia de estrés (Coakley *et al.*, 1999). El ciclo de la enfermedad puede desarrollarse simultáneamente y producir síntomas en diferentes partes de la planta esto resulta muy grave y la enfermedad puede ser aún mayor si el huésped está bajo la presión biótica de posibles agentes causales de problemas fitosanitarios, como la presencia de plagas o enfermedades, como la aparición de pudrición de la raíz causada por *Phytophthora cinnamomi* enfermedad común en el cultivo de aguacate (Desprez-Loustau *et al.*, 2006).

El hongo produce enzimas que degradan los tejidos del huésped, lo que representa una fuente de nutrientes y energía para el fitopatógeno. Tras la colonización de los tejidos, se inicia la producción de conidios en los picnidios, estructuras de reproducción asexual que emergen a través de la corteza de las ramas y el tronco (Valencia, 2019).

Los conidios son responsables de las infecciones secundarias de la enfermedad, son estructuras infecciosas que se propagan muy fácilmente a través de la salpicadura de lluvia y el viento, a través de insectos y herramientas contaminadas la esporulación es favorecida por condiciones de alta humedad (Pérez *et al.*, 2017).

Diagnóstico

Los canchros sobre el tejido leñoso son el síntoma más común y consistente ocasionado por géneros de la familia Botryosphaeraceae, es una alteración expandida a los tejidos corticales, de la parte central del árbol, produce necrosis y muerte del tejido, este síntoma se expresa con exudados acuosos o gomosos según la especie parasitada y con o sin reacciones hiperplásticas, observables en las células vivas circundantes. El diagnóstico de esta enfermedad se basa fundamentalmente en la identificación del síndrome junto con los signos específicos que produce el hongo según la especie (cuerpos fructíferos) (Sánchez *et al.*, 2013; Zlatkovic *et al.*, 2016).

Los síntomas en el tejido leñoso pueden presentarse también desde pequeñas zonas superficiales de corteza que penetra entre el cambium hasta la albura y lesiones alargadas que pueden llegar a ocupar una superficie considerable sobre la madera desde la base del tronco hasta zonas aéreas del árbol. Las lesiones suelen aparecer en el tronco principalmente, son asociadas con heridas hechas durante el debilitamiento y avance del fitopatógeno y se observan como zonas extensas de corteza infectada con un notable cambio en su coloración típica, un exudado de color blanco a crema resultado de la expulsión de sabia del árbol como respuesta de hipersensibilidad a la herida que más tarde se cristaliza y queda en forma de un polvillo de aspecto blancuzco, estas son bordeadas por abultamientos de la corteza de forma alargada, de aproximadamente 5 a 20 cm de longitud o más. Si las lesiones coalescen pueden anillar y matar al árbol. En la corteza muerta de las lesiones aparecen pústulas negras que corresponden a los pseudotecios del fitopatógeno (Doll *et al.*, 2015; Lawrence *et al.*, 2015).

Botryosphaeriales como problema fitosanitario importante en especies leñosas

Algunos géneros patógenos de especies de Botryosphaeriales, tienen un comportamiento peculiar y a su vez muy virulento, a este se le llama 'patógenos inactivos', es un hábito que también se le conoce como endófito pueden coexistir dentro de la planta y desarrollarse de una manera asintomática (como el género *Botryosphaeria* y especies de *Lasiodiplodia*) y tienen la capacidad de causar enfermedades después de un factor detonante, generado por sequía o un debilitamiento de la planta causado por otra infección por otro fitopatógeno más débil (Slippers y Winfield, 2007; Prusky *et al.*, 2013; Wyka y Broders, 2016).

Dentro de los hospederos más notables y de importancia agrícola se encuentran frutales de pepita como pomos, de semilla, frutos secos y frutillas. (Slippers *et al.*, 2007), existen también reportes de epidemias en plantas nativas de diferentes tipos de hábitats (Marincowitz *et al.*, 2008; Pavlic *et al.*, 2008; Jami *et al.*, 2015) en contraste los Botryosphaeriales también tienen géneros que poseen hospederos más estrechos pero igual de severos sobre las plantas infectadas por ejemplo: *Diplodia sapinea* en especies de *Pinus* sp. e incluso algunos muy específicos del huésped por ejemplo, *Eutiarospora darliae*, *E. pseudodarliae* y *E. tritici-australis* en trigo (Thynne *et al.*, 2019).

Botryosphaeriales asociados al cultivo del aguacate

En los huertos comerciales del cultivo de aguacate ubicados en la región productora del estado de Michoacán, se encuentra una zona conformada por municipios que destacan por condiciones

agroclimáticas distintas y que pertenecen a uno de los sitios con una superficie cultivada considerable desde hace ya varias décadas (Téliz *et al.*, 1999).

Existen reportes de algunos miembros de la familia Botryosphaeriaceae y a pesar de que son ya clásicos, se reportan como agentes causales de infecciones y asociados al síntoma de cancro en los troncos y ramas, que generalmente se localiza en la base de los troncos, aunque también puede afectar las raíces cercanas a la base del tallo (Coria, 1985). La enfermedad se localiza en todas las zonas productoras de aguacate de Michoacán, no existe un huerto con al menos una planta con este síntoma ya que en huertos jóvenes es muy común encontrarla también en la unión del injerto (Jiménez, 1987).

Campos (1984) sugiere una incidencia de 5 a 20%, pero en la actualidad se estima un valor más elevado por las malas prácticas agrícolas, diseminación de la enfermedad por condiciones climáticas cada vez más adversas. Como lo ha reportado Coria (1985) desde la década de los 80's con una incidencia del cancro en los árboles de hasta un 29% en huertos ubicados en Ziracuaretiro, Michoacán. El cancro del tronco se ha reportado *Nectria galligena*, con un conjunto más de hongos esto por trabajos realizados por Martínez (1974); Jiménez (1987) en el estado de Michoacán.

Importancia económica del cancro causado por Botryosphaeriaceae en el cultivo de aguacate

Dado el aumento en la incidencia en huertos de aguacate y el impacto económico de los síntomas de la enfermedad generados por miembros de esta familia y los informes recientes sobre la aparición de nuevas especies de Botryosphaeriaceae en plantas tropicales, es posible que varias especies de esta familia puedan estar asociadas con los cánceres y muerte de las plantas de *Persea americana* Miller en México. Para un manejo efectivo de la enfermedad, es necesario comprender claramente la etiología de la enfermedad, la identificación tanto morfológica como molecular es esencial para determinar la distribución de especies y la epidemiología de su enfermedad (Slippers y Wingfield, 2007; Mehl *et al.*, 2013).

Importancia de la identificación molecular de especies de Botryosphaeriaceae

Como en todas las identificaciones a nivel género y especie la familia Botryosphaeriaceae no es la excepción y se ha llevado a cabo de acuerdo con las características morfológicas de los anamorfos, como los conidiomas y conidios principalmente (Denman *et al.*, 2000). Sin embargo, es una práctica en la que no se había tomado en cuenta que estos hongos biológicamente poseen plasticidad genética la cual puede modificar fenotípicamente su morfología y puede ser activada por factores climáticos e inclusive por el hospedero donde se desarrollan y por otro lado muchas de las especies de Botryosphaeriaceae no fácilmente producen picnidios o conidio en medios de cultivo sintéticos (Liu *et al.*, 2012).

Un método de detección rápido y factible es realizar pruebas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), basado en el análisis de la secuencia de ADN esto proporcionaría una manera eficiente de detectar e identificar patógenos de plantas (Martin *et al.*, 2000; Abdollahzadeh y Zolfaghari, 2014). White *et al.* (1990) sugiere en sus investigaciones el uso de ITS (espaciador interno transcrito) región del ADN ribosomal (ADNr), es ideal usarlo como cebador para una detección basada en PCR, las regiones ITS generalmente son regiones conservadas dentro de una especie variable, otras regiones de genes comúnmente utilizadas para inferir relaciones filogenéticas y dilucidar especies dentro de la familia Botryosphaeriaceae son: tef1-#, tub2 y rpb2 que permitieron identificar especies con facilidad y un alto grado de certeza (Michailides, 2002; Ridgway *et al.*, 2011; Ni *et al.*, 2012; Cruywagen *et al.*, 2016).

Control de la enfermedad

Las medidas de control para los canchros ocasionados por especies de la familia Botryosphaeriaceae deben ser de tipo preventivo, ya que una vez presentes las lesiones, las medidas curativas son ineficaces (Junta de Andalucía, 2010). Está comprobado que las plantas vigorosas, sanas con un buen manejo agronómico y de nutrición son más resistentes a este tipo de enfermedades y aunque dadas las condiciones óptimas para que se desarrolle una infección como estrés, debilitamiento, riego excesivo, sombreado y en ocasiones daño mecánico impedirá al patógeno el establecimiento de la enfermedad (Ceja *et al.*, 2000).

En general, se recomienda mantener las plantaciones en condiciones favorables, para así evitar cualquier tipo de estrés innecesario (Junta de Andalucía, 2010). Una práctica primordial, dentro del manejo cultural que ha resultado muy efectivo para un buen control, es la eliminación de las ramas afectadas durante los periodos secos de verano o los de reposo invernal, siempre antes de las primeras lluvias de primavera, ya que con éstas se produce la mayor dispersión de las esporas y así podemos reducir la diseminación y proliferación de la enfermedad.

Entre estas medidas preventivas cabe destacar un mejor control con un manejo integrado, al asegurar que la humedad ambiental sea la menor posible (podas recurrentes), evitar las heridas mecánicas en la corteza del árbol, desinfectar las herramientas y sellar las heridas de poda. Otro tipo complementario de control preventivo es con productos fungicidas, en aspersiones dirigidas desde vía drench al sistema radicular, tronco y ramas, con productos con actividad biológica sistémica, ingredientes activos como Benomilo, fungicida sistémico de amplio espectro capaz de ser absorbido por el tejido leñoso, este inhibe así la infección fúngica (Luque *et al.*, 2008; Junta de Andalucía, 2010).

Sin embargo, algunas moléculas de este tipo tienen restricciones fitosanitarias que hace que ya no se puedan utilizar. De esta manera se han buscado alternativas a estas moléculas fúngicas y en su búsqueda se han implementado protectores de contacto como cobres (no absorbibles) o mezclas de ambos (sistémicos y de contacto) (Luque *et al.*, 2008).

Conclusiones

La familia Botryosphaeraeaceae es un grupo de hongos con miembros de fitopatógenos importantes a nivel mundial, la epidemiología de los Botryosphaerales son el agente causal de muchas enfermedades como: canchros, muerte regresiva y pudrición de raíces distribuidas en las zonas productoras de aguacate. La incidencia de la enfermedad ha aumentado considerablemente y como resultado se ha vuelto en una limitante en la producción y desarrollo del cultivo. Debido a lo anterior y bajo la demanda que generó dicho cultivo, es necesario poder identificar en forma rápida y veraz las especies asociadas a la enfermedad para conocer su biología y así diseñar alternativas de control.

Bibliografía

- 1 Abdollahzadeh, J. and Zolfaghari, S. 2014. Efficiency of rep-PCR fingerprinting as a useful technique for molecular typing of plant pathogenic fungal species: Botryosphaeriaceae species as a case study. FEMS Microbiology Letters. 36(2):144-157. Doi: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12624>.
- 2 Bega, R. V.; Smith, R. S.; Martinez, A. P. and Davis, C. J. 1978. Severe Damage to *Pinus radiata* and *P. pinaster* by *Lophodermium* spp. on Molokai and Lanai in Hawaii. Plant Disease Reporter. 62(04):329-331.
- 3 Belozerskaya, T. A.; Gessler, N. N. and Aver'yanov, A. A. 2017. Melanin Pigments of Fungi. Ed. Fungal Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4-29>. 263-291 pp.

- 4 Brown, E. A. and Britton, K. O. 1986. Botryosphaeriadiseases of apple and peach in the Southeastern United States. *Plant Disease*. 70(5):480-484.
- 5 Campos, A. J. 1984. Principales enfermedades del aguacate en Uruapan, Michoacán. *Simposium Sobre Cultivo, Producción y Comercialización del Aguacate. IV Congreso Nacional de A.N.E.F.A. Uruapan, Michoacán*. 73.
- 6 Ceja, T. L. F.; Téliz, O. D.; Osada, K. S. y Morales, G. J. L. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. *In: cuatro municipios del estado de Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología*. 18(2):79-86.
- 7 Coakley, S. M.; Scherm, H. and Chakraborty, S. 1999. Climate change plant disease management. *Annual Review of Phytopathology*. 37:399-426. DOI:10.1146/annurev.phyto.37.1.399
- 8 Coria, A. V. M. 1985. Distribución y etiología del cáncer en aguacate (*Persea americana* Miller) en la región de Uruapan, Michoacán. Tesis profesional. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", UMSNH. Uruapan, Michoacán. 80 p.
- 9 Crous, P. W.; Slippers, B.; Wingfield, M. J.; Rheeder, J.; Marasas, W. F. O.; Philips, A. J. L.; Alves, A.; Burgess, T.; Barber, P. and Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*. 55:235-253. Doi: 10.3114/sim.55.1.235.
- 10 Crous, P. W.; Wood, A. R.; Okada, G. and Groenewald, J. Z. 2008. Follicolous microfungi occurring on *Encephalartos*. *Pers. Mol. Phylogeny Evol. Fungi*. 21:135-146. Doi: <https://doi.org/10.3767/003158508X380612>.
- 11 Crous, P. W.; Wingfield, M. J.; Burgess, T. I.; Hardy, G. E. S. J.; Crane, C.; Barrett, S.; Le Roux, J. J.; Thangavel, R.; Guarro, J. and Stchigel, A. M. 2016. Fungal Planet description sheets: Persoonia. 37:218-403. Doi: <https://doi.org/10.3767/003158516X694499>.
- 12 Cruywagen, E. M.; Slippers, B.; Roux, J. and Wingfield, M. J. 2016. Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: a case of study on species from baobabs. *Fungal Biology*. 121(4):420-436. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.014>.
- 13 Denman, S.; Crous, P. W.; Taylor, J. E.; Kang, J. C.; Pascoe, I. and Wingfield, M. J. 2000. An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a re-evaluation of its anamorph based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*. 45:129-140.
- 14 Desprez-Loustau, M. L.; Marçais, B.; Nageleisen, L. M.; Piou, D. and Vannini, A. 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science*. 63(6):597-612. Doi: <https://doi.org/10.1051/forest:2006040>.
- 15 Doll, D. A.; Rolshausen, P. E.; Pouzoulet, J. and Michailides, T. J. 2015. First report of *Dothiorella iberica* causing trunk and scaffold cankers of almond in California. *Plant Disease*. 99(8):1185-1185. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1233-PDN>.
- 16 Everett, K. R.; Hallett, I. C.; Rees, G. J.; Chynoweth, R. W. and Henry, A. P. 2008. Avocado lenticel damage: The cause and the effect on fruit quality. *Postharvest Biology and Technology*. 48(3):383-390. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.008>.
- 17 Everett, K. R. 1999. Infection of unripe avocado fruit by stem end rot fungi in New Zealand. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 5:337-339.
- 18 Jami, F.; Slippers, B.; Wingfield, M. J.; Loots, M. T. and Gryzenhout, M. 2015. Temporal and spatial variation of Botryosphaeriaceae associated with *Acacia kar-rooin* South Africa. *Fungal Ecol*. 15:51-62. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2015.03.001>.
- 19 Jiménez, R. P. 1987. Memoria del primer curso fitosanitario y de nutrición en aguacate. Facultad de agrobiología "Presidente Juárez". Uruapan, Michoacán. 165-166 pp.
- 20 Junta de Andalucía. 2010. El Chancro del tronco del alcornoque causado por Botryosphaeria (Chancro de *Diplodia*). Consejería de Medio Ambiente. <https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/documents/20151/449530/chancro-tronco.pdf>.

- 21 Lawrence, D. P.; Travadon, R. and Baumgartner, K. 2015. Diversity of *Diaporthe* species associated with wood cankers of fruit and nut crops in northern California. *Mycologia*. 107(5):926-940. Doi: 10.3852/14-353.
- 22 Liu, J. K.; Phookamsak, R.; Doilom, M.; Wikee, S.; Li, Y. M.; Ariyawansa, H.; Boonmee, S.; Chomnunti, P.; Dai, D. Q.; Bhat, J. D.; Romero, A. I.; Zhuang, W. Y.; Monkai, J.; Jones, E. B. G.; Chukeatirote, E.; Ko, T. W.; Zhao, Y. C.; Wang, Y. and Hyde, K. D. 2012. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. *Fungal Diversity*. 57:149-210. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0207-4>.
- 23 Luque, J.; Pera, J. and Parlade, J. 2008. Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria corticola* on cork oak in Catalonia (NE Spain). *Forest Pathology*. 38(3):147-155. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2007.00526.x>.
- 24 Marincowitz, S.; Groenewald, J. Z.; Wingfield, M. J. and Crous, P. W. 2008. Species of Botryosphaeriaceae occurring on Proteaceae. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 21(1):111-118. Doi: 10.3767/003158508X372387.
- 25 Martin, R. R.; James, D. and Lévesque, C. A. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology*. 38:207-239. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.207>.
- 26 Martínez, B. R. 1974. Compendio de enfermedades del aguacatero en la región de Uruapan, Michoacán y áreas adyacentes. Pfizer. Uruapan, Michoacán, México. 10-11 pp.
- 27 Mehl, J. W. M.; Slippers, B.; Roux, J. and Wingfield, M. J. 2013. Cankers and Other Diseases Caused by the Botryosphaeriaceae. In: Gonthier, P. and Nico, G. Ed. *Infectious Forest Diseases*: CABI. 298-317 pp. Doi: <https://doi.org/10.1079/9781780640402.0298>.
- 28 Michailides, T. J.; Morgan, D. P.; Felts, D. and Phillimonte, J. 2002. First report of *Botryosphaeria rodhina* causing shoot blight of Pistachio in California. *Plant Disease*. 86(11):1273-1273. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1273C>.
- 29 Michailides, T. J. 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology*. 81(5):566-573.
- 30 Ni, H. F.; Yang, H. R.; Chen, R. S.; Hung, T. H. and Liou, R. F. 2012. A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of Botryosphaeriaceae species on mango. *European Journal of Plant Pathology*. 133(4):819-828. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0003-8>.
- 31 Nosanchuk, J. D. and Casadevall, A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5(4):203-223. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x>.
- 32 Pavlic, D.; Wingfield, M. J.; Barber, P.; Slippers, B.; Hardy, G. E. S. J. and Burgess, T. I. 2008. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia*. 100(6):851-866. Doi: <https://doi.org/10.3852/08-020>.
- 33 Pérez, O. G.; González, S. P.; Pérez, A. R. y Silverio, F. 2017. Enfermedades del aguacate causadas por especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae. La Laguna, España: Gobierno de Canarias. <https://www.icia.es/icia/download/publicaciones/Botryosphaeriaceae.pdf>.
- 34 Phillips, A. J. L.; Alves, A.; Abdollahzadeh, J.; Slippers, B.; Wingfield, M. J.; Groenewald, J. Z. and Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76(1):51-167. Doi: <https://doi.org/10.3114/sim0021>.
- 35 Phillips, A. J. L.; Hyde, K. D.; Alves, A. and Liu, J. K. 2019. Families in Botryosphaeriales: A phylogenetic, morphological and evolutionary perspective. *Fungal Divers.* 94(5):1-22. Doi: 10.1007/s13225-018-0416-6.
- 36 Prusky, D.; Alkan, N.; Mengiste, T. and Fluhr, R. 2013. Quiescent and Necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology*. 51:155-176. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102349>.

- 37 Ridgway, H. J.; Amponsah, N. T.; Brown, D. S.; Baskarathevan, E. E. J. and Jaspers, M. V. 2011. Detection of *Botryosphaeriaceae* species in environmental samples using a multi-species primer pair. *Plant Pathology*. 60(6):1118-1127. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02474.x>.
- 38 Sánchez, S.; Gambardella, M.; Henríquez, J. L. and Díaz, I. 2013. First report of crown rot of strawberry caused by *Macrophomina phaseolina* in Chile. *Plant Dis.* 97(7):996. Doi: 10.1094/PDIS-12-12-1121-PDN.
- 39 Slippers, B. and Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology, and impact. *Fungal Biology Reviews*. 21(2):90-106. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>.
- 40 Slippers, B.; Smit, W. A.; Crous, P. W.; Coutinho, T. A.; Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. 2007. Taxonomy, phylogeny, and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology* . 56(1):128-139. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01486.x>.
- 41 Swart, W. J. and Wingfield, M. J. 1991. Biology and Control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* Species in South Africa. University of the Orange Free State, Bloemfontein, South Africa. *Plant Disease* . Vol. 75 (8). 761-766 pp.
- 42 Téliz, D.; Mora, G. y Morales, L. 1999. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. In: Téliz, D. *El Aguacate y su Manejo Integrado*. Ed. Mundi-Prensa México, 3-16 pp.
- 43 Thynne, E.; Mead, O. L.; Chooi, Y. H.; McDonald, M. C. and Solomon, P. S. 2019. Acquisition and loss of secondary metabolites shaped the evolutionary path of three emerging phytopathogens of wheat. *Genome Biology and Evolution*. 11(3):890-905. Doi: <https://doi.org/10.1093/gbe/evz037>.
- 44 Valencia, A. L.; Gil, P. M.; Latorre, B. A.; Rosales, I. M. 2019. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species obtained from avocado stress with branch canker and dieback and from avocado fruit with stem end rot in Chile. *Plant disease*. 103:996-1005. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1131-RE>.
- 45 Von Arx, J. A. 1987. Plant pathogenic fungi. *Mycologia* . 79(6):919-920. <https://doi.org/10.2307/3807701>.
- 46 White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A. Editorial. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Ed. Academic Press Inc, New York. 315-322 pp.
- 47 Wyka, S. A. and Broders, K. D. 2016. The new family Septorioideaceae, within the Botryosphaeriales and *Septorioides strobil* as a new species associated with needle defoliation of *Pinus strobus* in the United States. *Fungal Biology* . 120(8):1030-1040. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.04.005>.
- 48 Zhang, W.; Groenewald, J. Z.; Lombard, L.; Schumacher, R. K.; Phillips, A. J. L. and Crous, P. W. 2021. Evaluating species in Botryosphaeriales. *Pers. Mol. Phylogeny Evol. Fungi* . 46:63-115. Doi: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.03>.
- 49 Zlatkovic, M.; Keca N.; Wingfield, M. J.; Jami F. and Slippers, B. 2016. Botryosphaeriaceae associated with the die-back of ornamental trees in the Western Balkans. *Antonie van Leeuwenhoek*. 109:543-564. Doi: 10.1007/s10482-016-0659-8.





Botryosphaeriaceae en el cultivo de aguacate

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 May 2024
Date accepted: 01 June 2024
Publication date: 19 August 2024
Publication date: Jul-Aug 2024
Volume: 15
Issue: 5
Electronic Location Identifier: e3745
DOI: 10.29312/remexca.v15i5.3745

Categories

Subject: Ensayo

Palabras clave:

Palabras clave:

cancro
control
enfermedad
secuencia
taxonomía

Counts

Figures: 1

Tables: 0

Equations: 0

References: 49

Pages: 0

Capítulo II

First report of *Trametes hirsuta* causing white rot in avocado: Epidemiological basis of cultivated trees in the state of Michoacán, México

Publicado en Pathogens, 14(6), 532. <https://doi.org/10.3390/pathogens14060532>



pathogens



Article

First Report of *Trametes hirsuta*, Causal Agent White Rot in Avocado Trees Grown in the State of Michoacán, México

Juan Mendoza-Churape, Ma. Blanca Nieves Lara-Chávez, Rosario Ramírez-Mendoza, César Ramiro Martínez-González, Hexon Angel Contreras-Cornejo, Yurixhi Atenea Raya-Montaño, Teresita del Carmen Ávila-Val and Margarita Vargas-Sandoval

Special Issue

An Update on Fungal Infections

Edited by

Dr. María del Rocío Reyes Montes and Dr. Esperanza Duarte-Escalante



<https://doi.org/10.3390/pathogens14060532>

Article

First Report of *Trametes hirsuta*, Causal Agent White Rot in Avocado Trees Grown in the State of Michoacán, México

Juan Mendoza-Churape ¹, Ma. Blanca Nieves Lara-Chávez ¹, Rosario Ramírez-Mendoza ², César Ramiro Martínez-González ³ , Hexon Angel Contreras-Cornejo ⁴, Yurixhi Atenea Raya-Montaño ¹, Teresita del Carmen Ávila-Val ¹ and Margarita Vargas-Sandoval ^{5,*} 

¹ Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan 60170, Michoacán, Mexico; juan.churape@umich.mx (J.M.-C.); blanca.lara@umich.mx (M.B.N.L.-C.); yurixhi@umich.mx (Y.A.R.-M.); tere.avila@umich.mx (T.d.C.Á.-V.)

² Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México, Mexico; rm_rosario@ciencias.unam.mx

³ Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Ciudad Victoria 87010, Tamaulipas, Mexico; ramiro_mg.unam@ciencias.unam.mx

⁴ Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Morelia, Morelia 58120, Michoacán, Mexico; marcenses@yahoo.com.mx

⁵ Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia 58030, Michoacán, Mexico

* Correspondence: margarita.vargas@umich.mx



Academic Editor: Katrina Ramonell

Received: 20 April 2025

Revised: 21 May 2025

Accepted: 23 May 2025

Published: 26 May 2025

Citation: Mendoza-Churape, J.; Lara-Chávez, M.B.N.; Ramírez-Mendoza, R.; Martínez-González, C.R.; Contreras-Cornejo, H.A.; Raya-Montaño, Y.A.; Ávila-Val, T.d.C.; Vargas-Sandoval, M. First Report of *Trametes hirsuta*, Causal Agent White Rot in Avocado Trees Grown in the State of Michoacán, México. *Pathogens* **2025**, *14*, 532. <https://doi.org/10.3390/pathogens14060532>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: México is the world’s leading producer of avocado, with 2,540,715 tons in the last year. *Trametes* spp. are macromycete fungi that rot wood. In 2022, in the state of Michoacán, México, sporomas of *Trametes* sp. were found in the trunks of avocado trees (*Persea americana* var. Hass) of 10 years old and older. The trees showed disease symptoms including yellowing of leaves, widespread defoliation, and wilting. It was observed that 10% of the infected trees were felled after heavy rains. In the place where the fungus settled, abundant cream-colored and cottony mycelium developed, causing “white rot”. The incidence of the disease in the sampled orchards was 60% in the tree population per hectare with 350 trees. The symptomatic trees studied were randomly selected from seven orchards. The collected fungal samples show typical structures corresponding to *Trametes* sp., including large sporomas, a pileus with a surface of concentric zones of various other tones, and a porous hymenium. The samples showed a 99% match with the species *Trametes hirsuta*. Laboratory bioassays of inoculation in fresh wood segments of avocado formed typical sporomas of the pathogen. Finally, the fungus was recovered and reisolated in vitro in PDA, and its identity was confirmed through the morphological characteristics and molecular tests. To the best of our knowledge, this article reports for the first time that *P. americana* cv. Hass and Mendez are new hosts for *T. hirsuta*. Therefore, the environmental and horticultural management conditions that favor the proliferation of *T. hirsuta* must be investigated.

Keywords: ITS; pathogenic fungus; *Persea americana*; polyporales; sporomas; wood decay fungus

1. Introduction

The genus *Trametes* (Polyporales: Polyporaceae) comprises wood-decay fungi, whose species are distributed in practically all terrestrial ecosystems colonized by trees that provide wood or food resources [1–6]. *Trametes* spp. are characterized by the presence of the sporoma firmly anchored to the trunk of the host tree, forming clusters. Although the

occurrence of *Trametes* is more common in the autumn season, it can be seen throughout the year [7,8].

Trametes has also been described as a phytopathogenic fungus that possesses a complex system of wood-degrading enzymes. In living trees, this class of fungi can produce infections through wounds and subsequently colonize and degrade wood tissue, with an extraordinary ability to survive even after the tree's death. In particular, *Trametes hirsuta* is one of the species that exhibit the aforementioned behavior [9,10]. For example, in 2017, *T. hirsuta* was reported for the first time as an agent of *Paulownia tomentosa* decline in Serbia [11]. Notably, when this fungus infects the tissue of its living host, it causes "white rot", the name given to this disease that, after 3 to 5 years, commonly causes death.

Avocado is a fruit of high nutritional value that is consumed by cultural tradition in México, but large quantities of this food are also exported to other places in the world. In Michoacán, México, large tracts of land are being planted with avocado trees to supply the demanding market. However, the production of these fruits has been affected by several plant pathogens, including some emerging macromycetes [12–15].

Therefore, the objectives of this work were the following: (i) to formally report for the first time the infection caused by *T. hirsuta* in avocado trees, (ii) to describe this fungal species as an emerging pathogen in the "avocado belt" of the state of Michoacán, (iii) to establish an epidemiological record on the incidence of the infection in avocado orchards in this producing region, and (iv) to verify through laboratory bioassays that *T. hirsuta* is the causative agent of white rot in the woody tissue of avocado trees. To answer these questions, both phytopathogenic and molecular tests were used.

2. Materials and Methods

2.1. Study Sites

Fungal specimens were collected during the 2022 fall–winter seasons. From the sampling sites, sporomes attached to branches and trunks of avocado trees with symptoms of the disease (yellowing, defoliation, and dieback) were collected, as well as woody tissue with a white coloration due to the presence of the fungal mycelium. Each of the samples was placed in resealable Ziploc® bags and labeled according to the order of collection, indicating the date and general data of the orchard. Sampling was carried out in avocado orchards in the area known as the "avocado belt" in Michoacán (19°13' N, 101°55' W), México (Figure 1). The sampled sites were localities with different agroclimatological conditions: Ziracuaretiro, Tacámbaro, Timgambato, Tancítaro, Pátzcuaro, Turicato, Salvador Escalante, Nuevo Parángaricutiro, and Uruapan. For an accurate record of the sampled sites, geographic data of longitude, latitude, and elevation were determined using a Global Positioning System (GPS-Garmin®).

2.2. Tree Selection and Sampling

The fungus was observed on 2450 adult avocado trees (*Persea americana* cv. Hass and Méndez) at the nine locations visited. The percentage of sporomas was calculated, considering the total inspected population as 100%. Fungal samples (n = 35 sporomes, 1 per tree, 5 per orchard) for morphophysiological, molecular, and phytopathological studies were randomly selected from 7 orchards. Tissue samples with white rot (n = 35, 1 per tree) were also collected from the same trees at the same sites.

The fungus was isolated on PDA (potato dextrose agar) culture medium, as well as on MEA (Malta Agar) for subsequent analysis.

For macroscopic characterization of the fungi, the synoptic keys described by Gilbertson and Ryvarden [1], Largent [16], and Kornerup et al. [17] were used. The fungal specimens and collected plant tissues were dried at 40–45 °C and stored in labeled card-

board boxes. The fungal specimens were deposited in the herbarium of the Phytopathology Laboratory of the Faculty of Agrobiology of the Michoacana University of San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.

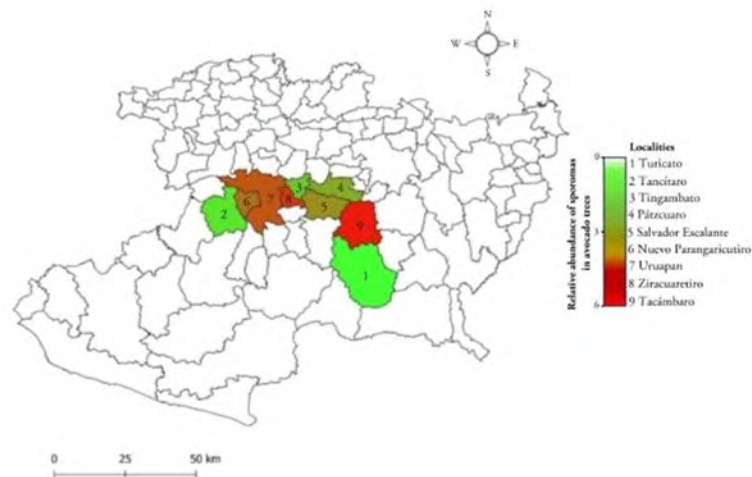


Figure 1. Sampling sites for *T. hirsuta* in avocado orchards in the state of Michoacán, México. In 2022, a population of 2450 trees was visited in the avocado belt, and 60% of the trees were observed to have formed sporomas. Detailed sporoma counts in trunks and branches were performed on $N = 66$ trees in these municipalities.

2.3. Characterization of the Fungus

To determine the microscopic characteristics of *Trametes*, longitudinal and transverse sections were made in the sporoma. The processed tissues were observed under a Nikon compound microscope. A calibrated micrometer was used to make measurements on the hyphal system, fibula, cystidia, basidia, and spores. Other characteristics such as shape, color, and wall thickness were also determined. Histochemical preparations were previously made on the fungal tissue to clarify it with KOH (5%). The size of the basidiospores was determined by measuring the length and width of 30 spores per sample, as described by Largent [16]. The range of length and width values is indicated with the symbol X. The variation in the length/width ratio of the basidiospores was determined and called Q.

For molecular identification of *Trametes*, genomic DNA was extracted using the CTAB method [17]. DNA was quantified with a Nanodrop 2000c (Thermo, Waltham, MA, USA). Dilutions of each sample at 20 ng were prepared to amplify the following five regions: (i) the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) regions corresponding to the internal transcribed spacers (ITSs) 5.8S rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2 (primers ITS5-ITS4), (ii) the section of DNA encoding the large ribosomal subunit 28S rRNA (primers LROR-LR3), both molecular markers as described by White et al. [18], (iii) the largest subunit of partial RNA polymerase II (rpb1), (iv) the second largest subunit of RNA polymerase II (rpb2; primers RPB2-5F/RPB2-7cR), and (v) translation elongation factor 1- α (tef1; primers 983F-2218R), all three protein-coding genes as described by Sung et al. [19].

The PCR reaction mix was prepared in a final volume of 13 μ L containing 1x Taq DNA polymerase enzyme buffer, 0.8 mM of deoxynucleoside triphosphate (0.2 mM each), 100 ng of DNA, 20 pmol of each primer, and 2 units of GoTaq DNA (Promega, Madison, WI, USA). The PCR amplification conditions for ITSs and LSUs were as follows: 3 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, with

a final extension at 72 °C for 10 min. The amplification condition for *tef1* consisted of an initial denaturation for 5.30 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 1.30 min, with a final extension at 72 °C for 10 min; for *rpb1* and *rpb2*, it consisted of an initial denaturation for 3 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 95 °C for 1 min, 52 °C for 2 min, and 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min [19].

All PCR reactions were carried out in a PTC-200 Peltier thermal cycler (BIORAD, Mexico City Mexico). PCR products were verified by agarose gel electrophoresis. Gels were run for 1 h at 95 V cm⁻³ in 1.5% agarose and 1× TAE buffer (Tris Acetate-EDTA). The gel was stained with GelRed (Biotium, Fremont, CA, USA) and bands were visualized on an Infinity 3000 transilluminator (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany). Amplified products were purified with the ExoSAP Purification kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), following the manufacturer's instructions. They were quantified and prepared for the sequencing reaction using a BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). These products were sequenced in both directions using an Applied Biosystem model 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). To generate consensus sequences, the sequences of both strands of each gene were analyzed, edited, and assembled using BioEdit version 7.0.5 [20]. These consensus sequences were compared with those deposited in GenBank at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the BLASTN 2.2.19 tool [21]. The sequences were subjected to standard Nucleotide BLAST searches in GenBank to determine the primary identity of the fungal isolates. *Lopharia cinerascens* [4] was used as an outgroup.

To study phylogenetic relationships, our newly produced sequences from nine *Trametes* individuals were added to the reference ITS, LSU, *rpb1*, *rpb2*, and *tef1* sequences deposited in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> accessed 24 January 2024). Each region was independently aligned using the online version of MAFFT v7 [22–24]. The alignments were reviewed in PhyDE v. 10.0 [25], followed by minor manual adjustments to ensure character homology between taxa. Matrices were formed for the ITS region with 99 taxa (685 characters), for the LSU region with 64 taxa (585 characters), for *rpb1* with 36 taxa (883 characters), for *rpb2* with 42 taxa (775 characters), and for *tef1* with 23 taxa (599 characters). Eleven partitioning schemes were established: one for the ITS region, one for the LSU region, three to represent the three codon positions of the *rpb1* gene region, three to represent the three codon positions of the *rpb2* gene region, and three to represent the three codon positions of the *tef1* gene region, which were established using the option to minimize stop codons with Mesquite v3.2 [26,27].

2.4. Data Analysis

The data were analyzed using maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference. Maximum parsimony analyses were carried out in PAUP* 4.0b10 [28] using the heuristic search mode, 1000 random starting replicates, and TBR branch swapping, with MULTREES and Collapse on. Bootstrap values were estimated using 1000 bootstrap replicates under the heuristic search mode, each with 100 random starting replicates. Maximum likelihood analyses were carried out in RAxML v. 8.2.10 [29] with a GTR + G model of nucleotide substitution.

To assess branch support, 10,000 rapid bootstrap replicates were run with the GTRGAMMA model. Bayesian inference was carried out in MrBayes v. 3.2.6 × 64 [30] with four chains, and the best model for alignment was sought using PartitionFinder [31,32]. Phylogenetic analyses were performed using MrBayes v3.2.6 × 64 [28]. The information block for the matrix included two simultaneous runs of Monte Carlo chains, temperature set to 0.2, and 10 million sampling generations (standard deviation ≤ 0.1). Chain convergence was visualized in Tracer v.1.6 [32]. The remaining trees were used to calculate a 50%

majority-rule consensus topology and posterior probabilities (PPs). Trees were visualized and optimized in FigTree v. 1.1.4 [33] and edited in Adobe Illustrator (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA).

2.5. Bioassays for Pathogenicity

Pathogenicity tests were performed by inoculating fungal mycelium (0.5 g of a pure *T. hirsuta* colony grown for 15 days on solidified nutrient medium (MEA)) on six-month-old avocado seedlings ($n = 63$ for three fungal isolates, 21 plants for each one) were inoculated at the root/stem intersection with 0.5 g of *T. hirsuta* mycelium. Seedlings without fungal inoculation were used as controls ($n = 9$). Fungal inoculation experiments were also performed on living woody tissue (13 segments of 15 cm and $\varnothing = 10$ cm per treatment, $n = 13$ per isolate [$N = 9$ control fragments]), freshly cut from 10-year-old trees grown under field conditions. It was placed in the central part of the section of the wood fragment held by a previously sterilized thumbtack. Likewise, inoculation was performed on wood fragments with MEA nutrient medium disks but without fungal mycelium for the controls. They were left in laboratory conditions at an average temperature of 18.5°C for 8 weeks. We used a randomized experimental design to evaluate the severity of disease symptoms, visually evaluating fungal growth and the texture, color, signs, and progression of disease in fresh wood.

3. Results

Table 1 records the geographical localization of the orchards, their altitude, and the annual precipitation data, indicating that infected trees are located in the avocado belt of Michoacán. Interestingly, sporomas of *Trametes* sp. were found attached in the trunks of avocado trees of 10 years old and older (Figure 2). The incidence of the disease in the sampled orchards was 60% per hectare with 350 trees. It was observed that less than 10% of the infected trees were felled after seasonal heavy rains. In the place of the tree where the fungus settled, abundant cream-colored and cottony mycelium formed, causing white rot. Each tree was found to have 2.89 ± 0.19 sporomas; 0.81 ± 0.07 on the trunk and 2.07 ± 0.14 on the branches, respectively (Figure 2). However, strictly evaluating the abundance of sporomas per tree, the localities with the highest counts were Tacámbaro and Ziracuaretiro, with five and six sporomas, respectively (Figure 1).

Table 1. Locations of avocado orchards in Michoacán, México, where *Trametes* sp. sporomas were collected are presented in bold font.

Municipality	Altitude	Precipitation	Coordinates	Incidence of Diseases by Location	Strain/Isolates
Ziracuaretiro	1571	1200	19.48°70'34" N; −101.96°31'72" W	1.71%	UMSNH 6
	1571	1200	19.46°16'25" N; −101.94°46'33" W	1.71%	UMSNH8
Tacámbaro	1654	1172	19.36°63'89" N; −101.44°91'97" W	3.42%	UMSNH1
Timgambato	1982	1100	19.50°11'47" N; −101.89°14'25" W	1.14%	UMSNH5
Tancítaro	2079	1800	19.33°87'34" N; −102.34°54'09" W	1.4%	UMSNH9
Pátzcuaro	2329	1200	19.46°80'28" N; −101.69°85'30" W	2.28%	UMSNH3

Table 1. Cont.

Municipality	Altitude	Precipitation	Coordinates	Incidence of Diseases by Location	Strain/Isolates
Turicato	1891	849	19.14°07'43" N; −101.59°46'08" W	1.71%	UMSNH2
Salvador Escalante	2200	1600	19.42°01'74" N; −101.76°63'53" W	2.57%	UMSNH8
Nuevo Parangaricutiro	1965	1800	19.43°67'40" N; −102.18°15'93" W	2.28%	UMSNH7
Uruapan	1620	1600	19.44°30'28" N; −102.02°15'48" W	4.57%	UMSNH4

Altitude is expressed in meters (m), The values of precipitation are the annual means represented in millimeters/metre².

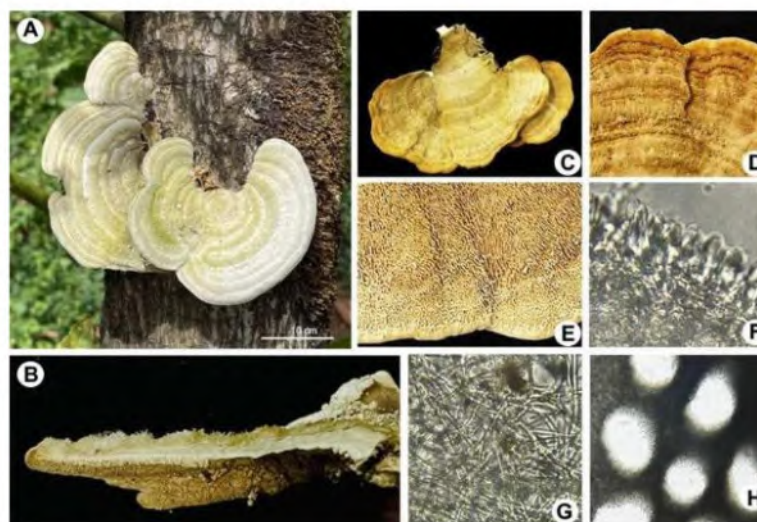


Figure 2. Macroscopic morphology of *Trametes* sp. (A) Presence of *Trametes* sp. in the form of a sporoma attached to the trunk of a 12-year-old avocado tree grown in an orchard in Michoacán, México. (B,C) Sporoma in its cross section and adaxial plane, respectively. (D) Pileus with surface of concentric zones of various ocher tones and covering of bristly villi. (E) Hymenium with irregular pores measuring 3 or 4 per mm, whitish to cream in color, with grayish hues and areas with ochraceous tones. (F) Basidia. (G) Thin-walled, hyaline hyphae (2.5–7.5 µm). (H) Round and angular pores.

The fungal samples show typical structures corresponding to *Trametes* sp., including large sporomas, a pileus structure with a surface of concentric regions of different ocher tones, and a porous hymenium (Figure 2). In vitro isolation of the fungus was carried out from the sporoma and tissues of infected trees. The fungal strains were maintained on potato dextrose agar (PDA) at 28 °C, where they formed a well-defined and confluent colony. After 20 days of incubation, cottony mycelium was formed, and it developed a slightly yellowish, opaque circular colony (Figure 3). Microscopic analysis of the fungus showed cream-colored cylindrical spores measuring an average of $8 \times 5 \mu\text{m}$ (270 structures counted per isolate [$N = 9$]; Figure 3).

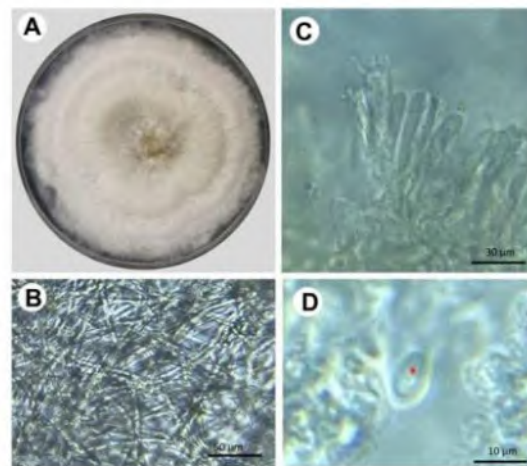


Figure 3. Mycelial and microscopic morphology of *Trametes* sp. (A) Fungal colony formed by the mycelial form of *Trametes* in PDA. (B) Hyaline mycelium from a 15-day-old fungal colony. (C) Basids (15–20 × 5–7 μm) and (D) Spore (8 × 5 μm); the red asterisk shows the localization of such structure. Sample collection in the avocado orchards took place during the rainy season of 2022.

For molecular characterization of the phytopathogen, PCR reactions were performed, and a phylogenetic tree was constructed (Figure 4; Table 2). In the Bayesian analysis, the standard deviation between chains stabilized at 0.001 after 3.5 million generations. No significant changes were observed in the tree topology trace or in the accumulated division frequencies of the selected nodes after approximately 0.25 million generations, which were discarded as 25% burn-in. Genetic analyses showed a 99% match with the species *T. hirsuta* (Figure 4).

Table 2. GenBank accessions numbers of the sequences employed in the phylogenetic analyses. Sequences data created in this study are presented in bold font.

Species Name	Isolate	Origin	ITS	LSU	GenBank Accessions		
					<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>
<i>Trametes aesculi</i>	HHB4626sp	USA	JN164950	----	KF573173	KF573134	KF573083
<i>Trametes aesculi</i>	FP105679sp	USA	JN164944	JN164799	JN164833	JN164861	JN164899
<i>Trametes aesculi</i>	HHB6551sp	USA	JN164938	----	KF573172	KF573163	KF573082
<i>Trametes aesculi</i>	FP105038sp	USA	JN164951	----	KF573174	KF573135	KF573081
<i>Trametes betulina</i>	HHB9942sp	USA	JN164983	JN164794	----	JN164860	----
<i>Trametes betulina</i>	Dai6847		KC848305	KC848390	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	MUCL: 40167	Malawi	JN645075	----	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	Dollinger 629	USA	KY264043	----	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	DMC814	Cameroon	KC589133	KC589159	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0135	Benin	MK736973	----	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0117	Benin	MK736972	----	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0093	Benin	MK736970	----	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0114	Benin	MK736971	MK736950	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0161	Benin	MK736975	MK736951	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0155	Benin	MK736974	----	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0171	Benin	MK736976	MK736952	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0173	Benin	MK736977	MK736953	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0178	Benin	MK736978	MK736954	----	----	----
<i>Trametes cingulata</i>	OAB0231	Benin	MK736979	MK736955	----	----	----
<i>Trametes cinnabarina</i>	Dai 14386	China	KX880629	KX880667	KX880818	KX880854	----
<i>Trametes coccinea</i>	Cui 7096		KC848330	KC848414	----	----	----
<i>Trametes conchifer</i>	FP106793sp	USA	JN164924	JN164797	JN164823	JN164849	----
<i>Trametes cubensis</i>	TJV93-213sp	USA	JN164923	JN164798	JN164834	JN164865	----
<i>Trametes cubensis</i>	AJ177	USA	JN164905	----	----	----	----
<i>Trametes cubensis</i>	UZ526-17	Malaysia	MF363158	----	----	----	----

Table 2. Cont.

Species Name	Isolate	Origin	ITS	LSU	GenBank Accessions		
					rpb1	rpb2	tef1
<i>Trametes ectypa</i>	FP10397sp	USA	JN164961	—	—	—	—
<i>Trametes ectypa</i>	FP10603T	USA	JN164929	JN164803	JN164824	JN164848	—
<i>Trametes elegans</i>	PR1133	Puerto Rico	JN164937	—	KF573178	KF573139	KF573075
<i>Trametes elegans</i>	FPR110	Philippines	JN164973	—	—	KF573138	KF573074
<i>Trametes elegans</i>	FP150762	Belize	JN164928	—	—	KF573137	KF573076
<i>Trametes flavida</i>	OAB0047	Benin	MK736966	MK736946	—	—	—
<i>Trametes flavida</i>	OAB0090	Benin	MK736967	—	—	—	—
<i>Trametes flavida</i>	OAB0196	Benin	MK736968	MK736947	—	—	—
<i>Trametes flavida</i>	DMC811	Cameroon	KC589130	KC589156	—	—	—
<i>Trametes flavida</i>	CBS 15835	—	MH855616	MH867126	—	—	—
<i>Trametes gibbosa</i>	DMC815	Cameroon	KC589144	KC589164	—	—	—
<i>Trametes gibbosa</i>	L11664sp	England	JN164943	JN164800	JN164831	JN164859	—
<i>Trametes hirsuta</i>	DMC341	Cameroon	KC589146	KC589166	—	—	—
<i>Trametes hirsuta</i>	RLG5133T	USA	JN164941	JN164801	JN164829	JN164854	—
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 1	Mexico	OR492495	OR492546	PQ961250	PQ972541	PQ978426
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 2	Mexico	OR492496	OR492547	PQ961251	PQ972542	PQ978427
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 3	Mexico	OR492497	OR492548	PQ961252	PQ972543	PQ978428
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 4	Mexico	OR492498	OR492549	PQ961253	PQ972544	PQ978429
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 5	Mexico	OR492499	OR492550	PQ961254	PQ972545	PQ978430
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 6	Mexico	OR492500	OR492550	PQ961255	PQ972546	PQ978431
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 7	Mexico	OR492501	OR492552	PQ961256	PQ972547	PQ978432
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 8	Mexico	OR492502	OR492553	PQ961257	PQ972548	PQ978433
<i>Trametes hirsuta</i>	UMSNH 9	Mexico	OR492503	OR492554	PQ961258	PQ972549	PQ978434
<i>Trametes junipericola</i>	145295 (O)	—	KC017758	KC017763	—	—	—
<i>Trametes lactinea</i>	DMC346	Cameroon	KC589126	KC589152	—	—	—
<i>Trametes lactinea</i>	CBS 109427	Taiwan	MH862825	—	—	—	—
<i>Trametes lactinea</i>	LIP: GUY09	French Guiana	JN645069	—	—	—	—
<i>Trametes lactinea</i>	Dai6865	—	KC848327	KC848411	—	—	—
<i>Trametes lactinea</i>	OAB0232	Benin	MK736983	MK736948	—	—	—
<i>Trametes lactinea</i>	BCC 33266	Thailand	GQ982888	GQ982881	—	—	—
<i>Trametes lactinea</i>	Yuan 5493	—	KC848320	KC848404	—	—	—
<i>Trametes ljubarskyi</i>	Weil653	—	KC848332	KC848416	—	—	—
<i>Trametes ljubarskyi</i>	L1286	—	KC848331	KC848415	—	—	—
<i>Trametes maxima</i>	OH189sp	Venezuela	JN164957	JN164804	JN164816	JN164864	—
<i>Trametes membranacea</i>	PRSC82	Puerto Rico	JN164945	JN164805	JN164832	JN164857	—
<i>Trametes menziesii</i>	BRFM FRA	Martinique	JN645103	—	—	—	—
<i>Trametes menziesii</i>	Dai6782	—	KC848289	KC848374	—	—	—
<i>Trametes meyenii</i>	—	Philippines	JN164933	—	KF573179	KF573145	—
<i>Trametes meyenii</i>	CBS45376	India	MH860991	MH872762	—	—	—
<i>Trametes neovillosa</i>	FP103050sp	USA	JN164958	JN164806	JN164835	JN164862	—
<i>Trametes ochracea</i>	HHB1344sp	USA	JN164954	JN164812	JN164826	JN164852	—
<i>Trametes ochracea</i>	Dai2005	China	KC848272	KC848357	—	—	—
<i>Trametes palisotii</i>	OAB0118	Benin	MK736980	MK736956	MK802884	MK802882	MK802886
<i>Trametes palisotii</i>	OAD0153	Benin	MK736981	MK736957	MK802885	MK802883	MK802887
<i>Trametes palisotii</i>	OAD0198	Benin	MK736982	MK736958	—	—	MK802888
<i>Trametes palisotii</i>	DMC360	Cameroon	KC589139	KC589160	—	—	—
<i>Trametes palisotii</i>	DMC817	Cameroon	KC589142	KC589163	—	—	—
<i>Trametes palisotii</i>	DMC816	Cameroon	KC589141	KC589162	—	—	—
<i>Trametes parvispora</i>	OAB002	Benin	MK736989	MK736964	—	MN127965	—
<i>Trametes parvispora</i>	OAB0023	Benin	MK736990	MK736965	—	MN127964	—
<i>Trametes polyzona</i>	DMC370	Cameroon	KC589125	KC589151	—	—	—
<i>Trametes polyzona</i>	Cui 11040	China	KX880647	KX880689	KX880836	KR610849	—
<i>Trametes polyzona</i>	BKW004	Ghana	JN164978	JN164790	—	—	—
<i>Trametes polyzona</i>	OAB0092	Benin	MK736984	MK736959	—	—	—
<i>Trametes polyzona</i>	OAB0128	Benin	MK736985	MK736960	—	—	—
<i>Trametes polyzona</i>	OAB0195	Benin	MK736986	MK736961	—	—	—
<i>Trametes pubescens</i>	FP101414sp	USA	JN164963	JN164811	JN164827	JN164851	—
<i>Trametes punicea</i>	BCC26408	Thailand	FJ372685	FJ372707	—	—	—
<i>Trametes punicea</i>	BCC27595	—	FJ372686	FJ372708	—	—	—
<i>Trametes rependa</i>	FRI437T	—	JN164985	—	KF573177	KF573142	KF573080
<i>Trametes rependa</i>	FPR1390	Philippines	JN164921	—	KF573175	KF573141	KF573077
<i>Trametes rependa</i>	OH271sp	Venezuela	JN164936	—	KF573176	KF573143	KF573079
<i>Trametes rependa</i>	M0138339	Papua New	KF573029	—	—	KF573140	KF573078
<i>Trametes sanguinea</i>	OAB0088	Benin	MK736969	MK736949	—	—	—
<i>Trametes sanguinea</i>	PRSC95	Puerto Rico	JN164982	JN164795	JN164842	JN164858	—
<i>Trametes sanguinea</i>	BCC 36861	Thailand	GQ982885	GQ982878	—	—	—
<i>Trametes sanguinea</i>	8R12	Thailand	FJ372672	FJ372694	—	—	—
<i>Trametes sanguinea</i>	CBS61473	Sri Lanka	MH860781	MH872513	—	—	—

Table 2. Cont.

Species Name	Isolate	Origin	ITS	GenBank Accessions			
				LSU	<i>rpb1</i>	<i>rpb2</i>	<i>tef1</i>
<i>Trametes socotrana</i>	BJFC12724	China	KC848313	KC848397	-----	-----	-----
<i>Trametes</i> sp.	BC1	Finland	KT896651	-----	-----	-----	-----
<i>Trametes suaveolens</i>	FP102529sp	USA	JN164966	JN164807	JN164828	JN164853	-----
<i>Trametes suaveolens</i>	Dai 10729	China	JN048770	JN048789	-----	-----	-----
<i>Trametes versicolor</i>	FP13515sp	USA	JN164919	JN164809	JN164825	JN164850	-----
<i>Trametes villosa</i>	FP17974R	USA	JN164969	JN164810	JN164830	JN164855	-----

The primers used for ITS were ITS1 and ITS2 and for LSU were LROR-LR3 and LRr [17]. Additionally, three protein-coding genes for RNA polymerase II were included, they were *rpb1*, the largest subunit and *rpb2* the second largest subunit (RPB2-5F/RPB2-7cR) and translation elongation factor 1- α (*tef1*, 983F- 2218R; [18]).

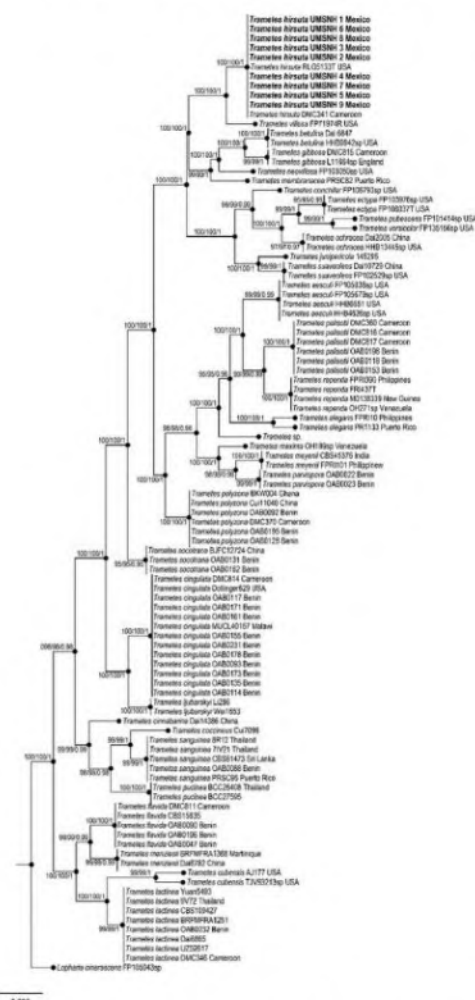


Figure 4. Phylogeny for *T. hirsuta* based on the concatenated ITS, LSU, *rpb1*, *rpb2*, and *tef1* sequences. No significant conflict (bootstrap value > 80%) was found between the topologies obtained through separate phylogenetic analyses. The scale bar indicates the expected number of nucleotide substitutions per site.

To fulfill Koch's postulates, 6-month-old avocado seedlings were inoculated with *T. hirsuta*. After 6 weeks, the seedlings showed signs of disease, such as chlorosis and generalized wilting of the leaves. When the root system was examined, the fungus was found to cause root rot (Figure 5). Interestingly, a voluptuous body of fungal biomass was observed in the lowest part of the stem of the seedlings, suggesting the formation of the sporoma primordium. A longitudinal section of the woody tissue of the tomato seedlings revealed softening and white rot in the tissue where the *T. hirsuta* mycelium had colonized (Figure 5).



Figure 5. Pathogenicity tests of *T. hirsuta* on avocado seedlings. (A) Foliage of the control treatment. Signs of the disease caused by the fungus: (B) chlorosis and (C) wilting. (D) Establishment of the fungus and formation of a dense body of fungal biomass associated with the host stem, red arrow phytopathogen mycelium. (E) Invasion and evident necrosis of the bark and part of the cambium of the young tissue of avocado seedlings. (F) Longitudinal section of the stem infected with *T. hirsuta* showing the softening of the woody tissue caused by the white rot (white dotted) of *T. hirsuta*.

To confirm whether isolates also exhibited wild-type infection behavior in the field, segments of fresh wood from avocado trees grown under field conditions were inoculated with *T. hirsuta* mycelium, and non-inoculated wood segments were used as controls. The first symptoms appeared 21 days after inoculation, which include the formation and development of mycelium on the woody tissue, causing white rot, with an evident change in the structure and texture of the tissue at 48 days and the appearance of fruiting bodies. It was clearly evident after 60 days that 98% of the inoculated samples developed clear signs and symptoms of the infection, and 77% of the cases developed severe mycosis, completely rotting the wood, as shown in the pathogenicity tests. After eight weeks, the formation of sporomas with dimensions of $2 \times 3 \times 0.2$ cm on average was observed, where 100% of the inoculated sites presented white rot at the inoculated site (Figure 6). Finally, the pathogen was recovered and reisolated in vitro on PDA, and its identity was confirmed through morphological characteristics and molecular tests.

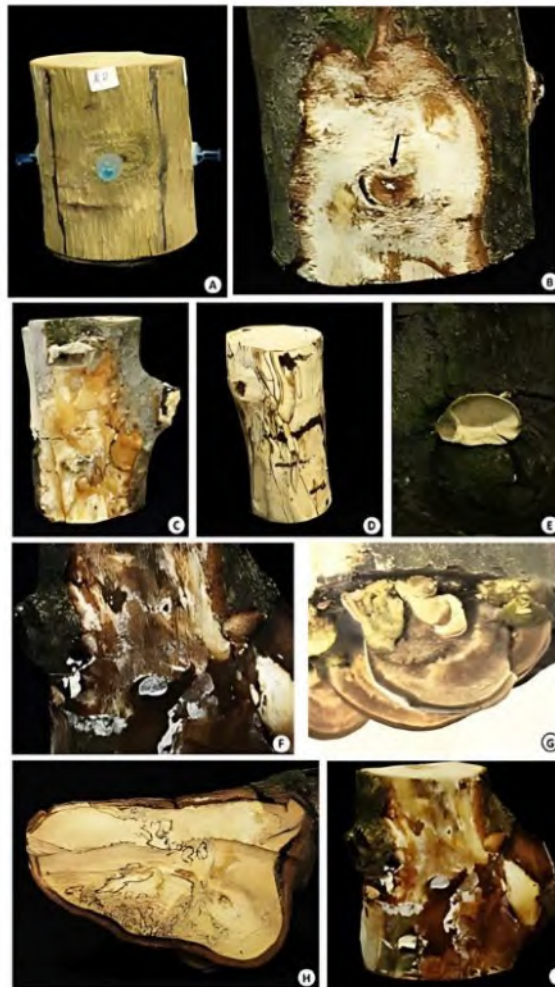


Figure 6. Pathogenicity tests for *T. hirsuta* in avocado woody tissue. (A) Control avocado trunk (control). (B) Cross section with lesion of the infection site where the phytopathogen was inoculated (black arrow). (C,F,I) Spongy-looking white rot with invasion of mycelium in the sapwood of the wood. (D) External diagnosis of the wood infection: pale coloration of the tissue is a characteristic sign of the white rot. (E) Primordium of *T. hirsuta*. (G) Sporomas obtained from inoculation, an evident sign of the disease. (H) Localized necrosis and white rot in the sapwood, heartwood, and pith of the tissue. The experiment was conducted twice with simulated results.

4. Discussion

Due to the number of trees showing signs and symptoms of disease in the “avocado belt” in Michoacán, México, a new phytosanitary alert emerged among producers. Phytopathological studies showed that the etiological agent of disease is *Trametes*, a fungus that forms sporomas on the trunks of trees ~10 years old and older. Several species of *Trametes* are part of the mycoflora of the state of Michoacán [34], which can be recognized in the field by their gray and brown sporomas [10]. Before 2022, these species did not cause phytosanitary problems in the region.

In the nine sampled locations, the highest number of sporomas was detected on the branches of trees infected with *Trametes*, revealing that the fungus has an efficient dispersal mechanism in the environment, mediated in part by air currents. Interestingly, comparing the average number of sporomas in the trees of the different locations, it was observed that precipitation is an important environmental factor that could favor the spread of fungus. Turicato, a locality with fewer sporomas per tree and low rainfall, was recorded, while the number of sporomas and rainfall were higher in the other locations, as in Ziracuaretiro. Interestingly, an examination of the map we constructed in this article shows that the nine localities where *Trametes* was found are interconnected, which strongly suggests the spread of the pathogen in the avocado belt of the state of Michoacán. However, it is necessary to investigate the environmental and horticultural management conditions that favor the proliferation of *Trametes* in more depth.

Molecular analysis confirmed that the species associated with avocado tree tissues was *T. hirsuta*. Several reports suggest that *T. hirsuta* is closely related to *Trametes villosa* [4,35], which is also supported by this work. In a strict census of the Polyporaceae family in México, it was shown that *T. hirsuta* and *T. villosa* are among the most widely distributed species in the country [36]. The latter species has the great ability of simultaneously depolymerizing lignin (a structural support component and protective barrier against pathogens), cellulose, hemicellulose, and pectin [37].

Interestingly, white rot lesions were clearly observed where this fungus colonizes, either in seedling tissue or in fresh wood segments. Previously, *T. hirsuta* was known as a saprobic fungus with a specialized enzyme complex for degrading lignin and other essential wood compounds [38,39]. During mycosis, white rot is due to the action of lignolytic enzymes that decompose numerous aromatic and structural components of wood [40]. Laccases (p-diphenol: dioxygen oxidoreductases) are a class of enzymes produced by most white rot fungi, where these enzymes degrade lignin, a complex polymer present in the cell walls of wood and bark, which is made up of phenylpropanoid units of three classes including coniferyl, sinapyl, and p-coumaryl alcohols [41,42]. Mn-oxidizing peroxidases also play an important role in lignin degradation [43].

T. hirsuta degrades 39.8% of lignin after 11 days, when this heteropolymer is the sole carbon source for the fungus; lignin degradation by this species includes the cleavage of C α -C α bonds and interunit β - β bonds [44]. Lignin degradation allows carbon to be reincorporated into the soil and activates the biogeochemical cycle of this element [45]. In addition to ligninolytic enzymes, *T. hirsuta* also produces cellobioses, cellulolytic enzymes, glyoxal oxidase (an H₂O₂-generating enzyme), hemicellulolytic enzymes, and xylanases [46], which are part of the molecular machinery necessary to degrade the structural components of wood.

On a physiological level, wood decay by *T. hirsuta* is characterized by cellular disaggregation, the formation of circular cavities, and pit erosion, indicating delignification [47]. This same fungus can form erosion channels through cellulose microfibrils, a characteristic of soft rot decay [47]. Our experiments revealed that *T. hirsuta* produced signs and symptoms in living wood similar to those observed in the field, highlighting the development of abundant cottony white mycelium that completely covers the affected areas between the heartwood and sapwood of the plant tissue. Notably, after 60 days, the formation of basidiomes attached to wood fragments was also observed, demonstrating that *T. hirsuta* is indeed the cause of white rot in avocado trees. *Trametes* is a xylotrophic fungus capable of surviving on fallen branches or wood debris [48].

Under field conditions, in seven avocado orchards, we visited at least 2450 trees, of which 1470 had anchored sporomas of *T. hirsuta*, representing 60% of the observed population. This fact demonstrates that the fungus caused a plant epidemic in the region. This negative event is partly due to poor forestry and agricultural practices, as occurs in other

forest outbreaks [49], and to the change in land use for large-scale avocado cultivation [50], which consequently alters the habitat and natural behavior of *Trametes* as a forest necromass wood-destroying fungus in the pine–oak forests of the region and provokes a change in the lifestyle of *T. hirsuta* as an emerging phytopathogen. This fact is very likely because in biochemical terms, white rot fungi have the ability to modulate their metabolism by controlling the tricarboxylic acid/glyoxylate bicycle [45], which can occur during the growth of the fungus on its substrate.

It was recently reported that changes in the substrate composition of *T. hirsuta*, following the addition of sawdust, significantly modified the production of volatile terpenes [51]. Furthermore, the type of substrate used as a carbon source and temperature are two key factors that considerably modulate gene expression in *Trametes pubescens*; it is noteworthy that temperature alters carbon metabolic enzymes and glycoside hydrolases in this species [52]. It is not common to observe *T. hirsuta* behaving as an endophytic fungus inducing beneficial effects on its host, but depending on the environmental conditions, the fungus modifies its behavior. For example, a strain of *T. hirsuta* was isolated from the roots of *Chenopodium album* and promoted the growth of *Triticum aestivum*, even in the presence of Pb [53]. Therefore, the change in the behavior of *T. hirsuta*, as a pathogenic fungus beneficial to plants or as a decomposer of organic matter, is an outstanding characteristic of this organism depending on the environmental conditions prevailing in its ecological niche.

An important study showed that *Trametes* sp., *Trametes versicolor*, and *T. villosa* are part of the wood-decomposing basidiomycete species of the Andean Forest in Boyacá, Colombia, consisting of oaks [54], which indicates that forest ecosystems, common in México, are the ecological niche of fungal species with high lignocellulolytic activity [4,45]. Currently, *T. hirsuta* is present in America, Asia, and Europe [4,8,55,56], although the site of origin of this species and whether all these isolates belong to the same lineage, as well as its dispersal mechanism, are unknown.

In part, the phytosanitary problem arises because the fungus is present in its natural habitat, and when avocado trees are introduced as a new species into the soil, the fungus continues its ecological function, finding its new host in the trees. The problem of fungal infection is further complicated because the new avocado trees grown in these sites are now susceptible to extreme climatic conditions, such as low temperatures and drought. The latter factor is caused by climate change and the excessive use of water for the maintenance and formation of new avocado orchards, which causes severe water shortages throughout the producing region and increases the susceptibility of the entire tree population to damage caused by *T. hirsuta*, as occurs with other pathogens in other plants [49].

Another aspect to consider is the fact that during and after weed pruning in avocado orchards, the tree's integrity is neglected, and physical damage to some part of the tree is reported, with wounds being an entry route for *Trametes*. In our previous sampling activities in avocado orchards (15 years ago), we observed that *Trametes* sp. colonized tissue damaged or weakened by external factors, such as breaks in the sapwood of the woody tissue associated with drastic temperature fluctuations or mechanical damage from pruning, which have been direct entry points for the phytopathogen (personal communication). Furthermore, once pruning is performed, whether for sanitation or rejuvenation of trees, the first symptoms and the appearance of fruiting bodies are recorded between two to three years after the penetration and development of the infection.

The first case of *T. hirsuta* causing deterioration of a *Paulownia tomentosa* plantation in Serbia also emerged from monitoring the health of trees in the area of the Medveja Village, near the town of Trstenik. This plantation was 5 years old and was constructed with one-year-old seedlings, where the fungus also caused white rot [11]. Bioassays we performed on fresh wood segments showed that the fungus does not produce fruiting

bodies immediately after primary infection, and signs of infection appear when a large proportion of the wood is already colonized by the plant pathogen's mycelium.

Liers et al. [57] indicated that the specialization of white rot fungi such as *T. hirsuta* has been originally described with a preference for hardwoods, but without affinity for any particular plant species, which explains the infection of the fungus in avocado orchards, since the wood of this tree is semi-hard and not very resistant, which facilitates its colonization and degradation by *Trametes*. A critical analysis of the literature revealed that in the central Black Earth region of Russia, *T. hirsuta* is a fungus that grows on fruit tree species [9], which also constitutes a background on the behavior of this organism affecting the flora of agricultural interest in temperate ecosystems such as the pine-oak forests of Michoacán.

The environmental and horticultural management conditions that favor the proliferation of *T. hirsuta* should be investigated and phytosanitary protocols should be established to prevent its spread to other avocado-producing regions. This fact is very important because practically all terrestrial ecosystems with tree species have the environmental conditions to allow the reproduction and proliferation of these class of fungi, according to the map of *Trametes* diversity worldwide presented by Olou and co-workers [4]. A promising alternative for the control of *T. hirsuta* is the use of biological control agents such as *Trichoderma*, which under experimental conditions managed to significantly inhibit the growth of the pathogen [58].

Finally, to our knowledge, this work reports for the first time that *P. americana* is a new host for *T. hirsuta* and that this fungal species is a new pathogen of avocado trees grown in Michoacán, the main producing state in México and worldwide. Furthermore, this manuscript establishes the epidemiological basis for the pathogen's proliferation in the region and sets a precedent for monitoring and preventing the spread of *T. hirsuta* to other regions in Michoacán and worldwide where avocado seedlings are exported from nurseries. In the first reports of the disease, it was associated with severe death, and it is suggested that once the disease has been identified, according to the signs and symptoms already established in this work, cultural work such as pruning should be carried out, where not only the inoculum is eliminated but also an environment not conducive to the development of the pathogen is maintained. In initial cases of infection, after the removal of damaged tissue, applications of antifungal chemical molecules belonging to the Triazoles group should be made, due to their systemic effect and their biological effectiveness in inhibiting the growth and development of a significant number of phytopathogenic fungi [59].

Author Contributions: Conceptualization, J.M.-C. and M.B.N.L.-C.; Methodology, R.R.-M., C.R.M.-G., Y.A.R.-M. and T.d.C.Á.-V.; Formal analysis, J.M.-C., M.B.N.L.-C., H.A.C.-C. and M.V.-S.; Investigation, J.M.-C., M.B.N.L.-C. and M.V.-S.; Writing—original draft, J.M.-C., M.B.N.L.-C. and M.V.-S.; Writing—review & editing, H.A.C.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the CIC research project at Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Institutional Review Board Statement: This study did not require approval from an Institutional Review Board.

Informed Consent Statement: No studies involving humans were conducted in this research.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this work are available from the corresponding author upon reasonable request. The sequenced amplicons are available on NCBI. The data underlying this article will be shared at reasonable request to the corresponding author.

Acknowledgments: This work was financially supported by the Scientific Research Council (UMSNH, grant no. 5). CRMG would like to thank Laura Márquez and Nelly López, LaNaBio of the Institute of Biology of the National Autonomous University of Mexico for sequencing PCR products. The

first author thanks CONAHCYT, now Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación (secihti) for the doctoral scholarship.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Gilbertson, R.L.; Ryvarden, L. *North American Polypores: Megasperoporia-Wrightoporia*; Fungiflora: Oslo, Norway, 1989; pp. 434–885.
2. Ryvarden, L. Genera of polypores, nomenclature and taxonomy. In *Synopsis Fungorum*; Fungiflora: Oslo, Norway, 1991; p. 363.
3. Carlson, A.; Justo, A.; Hibbett, D.S. Species delimitation in *Trametes*: A comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. *Mycologia* **2014**, *106*, 735–745. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Olou, B.A.; Krah, F.S.; Piepenbring, M.; Yorou, N.S.; Langer, E. Diversity of *Trametes* (Polyporales, Basidiomycota) in tropical Benin and description of new species *Trametes parvispora*. *MycKeys* **2020**, *65*, 25–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Castello, I.; Polizzi, G.; Vitale, A. Major Pathogens Affecting Carob in the Mediterranean Basin: Current Knowledge and Outlook in Italy. *Pathogens* **2023**, *12*, 1357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Hong, Y.; Tan, J.Y.; Xue, H.; Chow, M.L.; Ali, M.; Ng, A.; Leong, A.; Yeo, J.; Koh, S.M.; Tang, M.S.Y.; et al. A Metagenomic Survey of Wood Decay Fungi in the Urban Trees of Singapore. *J. Fungi* **2023**, *9*, 460. [\[CrossRef\]](#)
7. Yuan, Y.; Wu, Y.-D.; Wang, Y.-R.; Zhou, M.; Qiu, J.-Z.; Li, D.-W.; Vlasák, J.; Liu, H.-G.; Dai, Y.-C. Two new forest pathogens in *Phaeolus* (Polyporales, Basidiomycota) on Chinese coniferous trees were confirmed by molecular phylogeny. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 942603. [\[CrossRef\]](#)
8. Volobuev, S.V.; Bolshakov, S.; Shakhova, N.V. Synopsis of the macrofungi (Basidiomycota) on wood of fruit trees in the Central black Earth Region of Russia. *S. Russ. Ecol. Dev.* **2020**, *15*, 75–98. [\[CrossRef\]](#)
9. Perdomo, O.P.; Lodge, J.; Ortega, D. *Porus: Hongos Poriales de la República Dominicana*; Sociedad Dominicana de Micología, Ed.; Búho: Santo Domingo, Dominican Republic, 2021; pp. 1–90.
10. De Aza, M.J.; de la Rosa, J.G.; Santos, H.J. Nuevo récord de *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd (Basidiomycota) en refugio de vida silvestre laguna Mallén, San Pedro de Macorís-República Dominicana. *Cienc. Ambiente Y Clima* **2021**, *4*, 19–27. [\[CrossRef\]](#)
11. Milenković, I.; Tomsóvský, M.; Karadžić, D.; Veselinović, M. Decline of *Paulownia tomentosa* caused by *Trametes hirsuta* in Serbia. *For. Pathol.* **2018**, *48*, e12438. [\[CrossRef\]](#)
12. Marais, L.J. Avocado Diseases of Major Importance Worldwide and their Management. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II*; Naqvi, S.A.M.H., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2004. [\[CrossRef\]](#)
13. Mendoza-Churape, J.; Martínez-González, C.R.; Raymundo, T.; Valenzuela, R.; Barrios, P.A.; Sandoval, M.V.; Lara-Chávez, M.B.N. Occurrence and pathogenicity of the wood decay fungi *Ganoderma australe* and *G. curtisii* in avocado trees in Michoacán, Mexico. *Nova Hedwig.* **2024**, *118*, 133–156. [\[CrossRef\]](#)
14. Çalış, Ö.; Çelik, S.; Fidan, H.; Tek, M.I.; Shah, M.; Tozlu, I.; Wani, S.H. Emerging pathogens and disease dynamics threatening avocado production in southern Türkiye. *J. Plant Dis. Prot.* **2024**, *131*, 1653–1663. [\[CrossRef\]](#)
15. Cisneros-Zambrano, A.; Mendoza-Churape, A.; Contreras-Cornejo, H.A.; Raya Montañó, Y.A.; Martínez-González, C.R.; Raymundo, T.; Valenzuela, R.; Vargas-Sandoval, M.; Ruiz-Valencia, J.A.; Lara-Chávez, M.B.N. First report of *Irpex rosettiformis* causing white root rot in avocado trees in Michoacán, México. *Plant Dis.* **2024**, *108*, 805. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Largent, D.L. *How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features*; Eureka, Ed.; Mad River Press: Eureka, CA, USA, 1973; pp. 1–151.
17. Jaeger, E.E.M.; Carroll, N.M.; Choudhury, S.; Dunlop, A.A.S.; Towler, H.M.A.; Matheson, M.M.; Adamson, P.; Okhravi, N.; Lightman, S. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 2902–2908. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1990; pp. 315–322.
19. Sung, G.H.; Sung, J.M.; Hywel-Jones, N.L.; Spatafora, J.W. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Mol. Phylogenetics Evol.* **2007**, *44*, 1204–1223. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhao, C.; Fraczek, M.G.; Dineen, L.; Lebedinec, R.; Macheleidt, J.; Heinekamp, T.; Delneri, D.; Bowyer, P.; Brakhage, A.A.; Bromley, M. High-throughput gene replacement in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2019**, *54*, e88. [\[CrossRef\]](#)
21. Hall, T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *41*, 95–98.
22. Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L.; Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **2000**, *7*, 203–214. [\[CrossRef\]](#)

23. Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.; Miyata, T. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3059–3066. [CrossRef]
24. Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* **2017**, *20*, 1160–1166. [CrossRef]
25. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [CrossRef]
26. Müller, K.; Quandt, D.; Müller, J.; Neinhuis, C.; PhyDE®-Phylogenetic Data Editor. Program Distributed by the Authors, Version 10.0. 2005. Available online: <https://www.phyde.de> (accessed on 3 November 2022).
27. Maddison, W.P.; Maddison, D.R. Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis. 2017. Available online: <http://mesquiteproject.org> (accessed on 20 February 2024).
28. Swofford, D.L. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*, Version 4; Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA, 2002.
29. Lanfear, R.; Calcott, B.; Kainer, D.; Mayer, C.; Stamatakis, A. Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. *BMC Evol. Biol.* **2014**, *14*, 82. [CrossRef]
30. Huelsenbeck, J.P.; Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian Inference of Phylogeny. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 754–755. [CrossRef] [PubMed]
31. Frandsen, P.B.; Calcott, B.; Mayer, C.; Lanfear, R. Automatic selection of partitioning schemes for phylogenetic analyses using iterative k-means clustering of site rates. *BMC Evol. Biol.* **2015**, *15*, 13. [CrossRef] [PubMed]
32. Lanfear, R.; Frandsen, P.B.; Wright, A.M.; Senfeld, T.; Calcott, B. Partition Finder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 772–773. [PubMed]
33. Rambaut, A. FigTree v1.4.2 [WWW Document]. 2016. Available online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed on 17 April 2018).
34. Mukhtar, I.; Arredondo-Santoyo, M.; Vázquez-Garcidueñas, M.S.; Vázquez-Marrufo, G. Isolation and molecular identification of laccase-producing saprophytic/phytopathogenic mushroom-forming from various ecosystems in Michoacán state, Mexico. *Acta Mycol.* **2019**, *54*, 1119. [CrossRef]
35. Justo, A.; Hibbett, D.S. Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon* **2011**, *60*, 1567–1583. [CrossRef]
36. Gafforov, Y.; Ordynets, A.; Langer, E.; Yarasheva, M.; Gugliotta, A.D.; Schigel, D. Species diversity with comprehensive annotations of wood-inhabiting poroid and corticioid fungi in Uzbekistan. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 598321. [CrossRef]
37. Valenzuela Garza, R. *Las Familias Polyporaceae Sensu Stricto y Albatrellaceae en México*; Informe Final SNIB-CONABIO Proyecto No. H201; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional: México City, México, 1991.
38. Ribeiro Tomé, L.; Dornelles Parise, M.T.; Parise, D.; de Carvalho Azevedo, V.A.; Brenning, B.; Badotti, F.; Góes-Neto, A. Pure lignin induces overexpression of cytochrome P450 (CYP) encoding genes and brings insights into the lignocellulose depolymerization by *Trametes villosa*. *Heliyon* **2024**, *10*, e28449. [CrossRef]
39. Barrasa, J.M.; Blanco, M.N.; Esteve-Ravento, F.; Altes, A.; Checa, J.; Martínez, A.T.; Ruiz-Dueñas, F.J. Wood and humus decay strategies by white-rot basidiomycetes correlate with two different dye decolorization and enzyme secretion patterns on agar plates. *Fungal Genet. Biol.* **2014**, *72*, 106–114. [CrossRef]
40. Riseh, R.S.; Fathi, F.; Lagzian, A.; Vatankhah, M.; Kennedy, J.F. Modifying lignin: A promising strategy for plant disease control. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *271*, 132696.
41. Bumpus, J.A.; Aust, S.D. Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* involvement of the lignin-degrading system. *BioEssays* **1987**, *6*, 166–170. [CrossRef]
42. Thurston, C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **1994**, *140*, 19–26. [CrossRef]
43. Moiseenko, K.V.; Glazunova, O.A.; Savinova, O.S.; Vasina, D.V.; Zhrebker, A.Y.; Kulkova, N.A.; Nikolaev, E.N.; Fedorova, T.V. Relation between lignin molecular profile and fungal exo-proteome during kraft lignin modification by *Trametes hirsuta* LE-BIN 072. *Bioresour. Technol.* **2021**, *335*, 125229. [CrossRef] [PubMed]
44. Knezevic, A.; Milovanovic, I.; Stajic, M.; Vukojevic, J. *Trametes* species to degradate lignin. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, *85*, 52–56. [CrossRef]
45. Ma, J.; Li, Q.; Wu, Y.; Yue, H.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Shi, M.; Wang, S.; Liu, G.Q. Elucidation of ligninolysis mechanism of a newly isolated white-rot basidiomycete *Trametes hirsuta* X-13. *Biotechnol. Biofuels* **2021**, *14*, 189. [CrossRef]
46. Kato, H.; Miura, D.; Kato, M.; Shimizu, M. Metabolic mechanism of lignin-derived aromatics in white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2024**, *108*, 108–532. [CrossRef]
47. Vasina, D.V.; Pavlov, A.R.; Koroleva, O.V. Extracellular proteins of *Trametes hirsuta* st. 072 induced by copper ions and a lignocellulose substrate. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 106. [CrossRef]
48. Bhatt, I.M.; Pramod, S.; Koyani, R.D.; Rajput, K.S. Anatomical characterization of Eucalyptus globulus wood decay by two white rot species of *Trametes*. *J. Plant Pathol.* **2016**, *98*, 227–234.

49. Fedorova, T.V.; Shakhova, N.V.; Klein, O.I.; Glazunova, O.A.; Maloshenok, L.G.; Kulikova, N.A.; Psurtseva, N.V.; Koroleva, O.V. Comparative analysis of the ligninolytic potential of basidiomycetes belonging to different taxonomic and ecological groups. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2013**, *49*, 570–580. [\[CrossRef\]](#)
50. Contreras-Cornejo, H.A.; Larsen, J.; Fernández-Pavía, S.P.; Oyama, K. Climate change, a booster of disease outbreaks by the plant pathogen *Phytophthora* in oak forests. *Rhizosphere* **2023**, *27*, 100719. [\[CrossRef\]](#)
51. Arredondo-León, C.; Muñoz-Jiménez, J.; García-Romero, A. Recent changes in landscape-dynamics trends in tropical highlands, central Mexico. *Interciencia* **2008**, *33*, 569–577.
52. Shabaev, A.V.; Fedorova, T.V. Influence of a wood substrate on the profile of volatile organic compounds produced by white rot fungus *Trametes hirsuta* LE-BIN072. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2024**, *60*, 1240–1251. [\[CrossRef\]](#)
53. Peng, M.; Bervoets, S.; Chin-A-Woeng, T.; Granchi, Z.; Hildén, K.; Mäkelä, M.R.; de Vries, R.P. The transcriptomic response of two basidiomycete fungi to plant biomass ins modulated by temperature to a different extent. *Microbiol. Res.* **2023**, *270*, 127333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Malik, A.; Butt, T.A.; Alam Naqvi, S.T.; Yousaf, S.; Qureshi, M.K.; Zafar, M.I.; Farooq, G.; Nawaz, I.; Iqbal, M. Lead tolerant endophyte *Trametes hirsuta* improved the growth and lead accumulation in the vegetative arts of *Triticum aestivum* L. *Heliyon* **2020**, *6*, e04188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Tomsövsý, M.; Kolaří, M.; Paňoutová, S.; Homolka, L. Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwig*. **2006**, *82*, 269–280. [\[CrossRef\]](#)
56. Horisawa, S.; Yoshida, M.; Umezawa, K.; Wada, T.; Abe, H.; Doi, S.; Samejima, M.; Momohara, I. Diversity and community structure of wood-inhabiting fungi found in Japanese wooden houses analyzed by the next-generation sequencing. *J. Wood Sci.* **2017**, *63*, 369–378. [\[CrossRef\]](#)
57. Liers, C.; Ullrich, R.; Pecyna, M.; Schlosser, D.; Hofrichter, M. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Enzym. Microb. Technol.* **2007**, *41*, 785–793. [\[CrossRef\]](#)
58. Hincal, S.; Yalcin, M. Biological control of some wood-decay fungi with antagonistic fungi. *Biodegradation* **2023**, *34*, 597–607. [\[CrossRef\]](#)
59. Vasilchenko, A.V.; Poshvina, D.V.; Semenov, M.V.; Timofeev, V.N.; Iashnikov, A.V.; Stepanov, A.A.; Pervushina, A.N.; Vasilchenko, A.S. Triazoles and Strobilurin Mixture Affects Soil Microbial Community and Incidences of Wheat Diseases. *Plants* **2023**, *12*, 660. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Capítulo III

**Pathogenicity of *Neofusicoccum parvum* (Botryosphaeriaceae), on avocado fruits
(*Persea americana* Mill) in the most important productive region of Mexico**

Pathogenicity of *Neofusicoccum parvum* (Botryosphaeriaceae), on avocado fruits (*Persea americana* Mill) in the most important productive region of Mexico

Juan Mendoza-Churapel¹ (0000-0003-0141-2456), César Ramiro Martínez-González² (0000-0002-0256-0840), Yenitze A. García-Martínez³ (0000-0001-7407-5660), Margarita Vargas-Sandoval⁵ (0000-0002-4835-8779), Patricio Apaéz-Barrios⁵ (0000-0002-5647-4788), Benjamin Grayeb Armas³, Tania Raymundo⁴ (0000-0002-7525-0034)

¹Estudiante de Doctorado. Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas. Área Conservación y Manejo de Recursos Naturales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, Código Postal 60170, Uruapan, Michoacán, México

²Universidad Autónoma Chapingo, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotécnia de México, km 38.5 Carretera Federal México-Texcoco, Texcoco 56230, México; ramiro_mg.unam@ciencias.unam.mx

³Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Laboratorio de Fitopatología, Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, Código Postal 60170, Uruapan, Michoacán, México

⁴Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Botánica. Laboratorio de Micología. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n. Col. Santo Tomás, Alcaldía Miguel Hidalgo, C. P. 11340, Ciudad de México, CDMX, México

⁵Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología, Gral. Francisco J. Múgica S/N, Felicitas de Río, Código Postal 58030, Morelia, Michoacán, México

Abstract

This study describes the symptoms and pathogenicity caused by *Neofusicoccum parvum* in fruits of *Persea americana* var. Hass, commonly known as avocado, in orchards from the most important growing region in Mexico. *N. parvum* causes black rot in avocado fruits, and its presence was confirmed using morphological and molecular data. Therefore, this species is considered a potential phytopathogen due to its rapid virulence in fruits and seedlings.

Key words: Aguacate, black spot, disease, black rot, Uruapan, Virulence.

Introduction

Persea americana Mill. is a species of considerable agricultural importance and with notable relevance to the forestry sector. It comprises three recognized horticultural varieties, which are classified based on the geographic regions where they were originally domesticated:

Guatemalan (*P. americana* var. *guatemalensis*, L.O. Williams), Mexican (*P. americana* var. *drymifolia*), and West Indian (*P. americana* var. *americana*) (Wu et al. 2008; Ibarra-Laclette et al. 2015; Ren et al. 2020; Ashworth and Rolshausen 2025).

The commercial exploitation of these varieties is primarily focused on their fruit, commonly known as the Hass avocado, which is considered a hybrid between the Guatemalan and Mexican types. This cultivar combines the thick, rough skin characteristic of the Guatemalan variety with the high oil content that is typical of the Mexican type. Due to its favorable organoleptic properties, nutritional profile, and well-documented health benefits, the Hass avocado has gained widespread international popularity (Pedreschi et al. 2019; Edwards et al. 2020; Cheng et al. 2021; Thompson et al. 2021; Henning et al. 2022).

The importance of avocado cultivation is underscored by a 29% increase in the area dedicated to its production between 2016 and 2020. A primary factor of this growth in global production is the interaction between supply and demand, associated with high prices that generate economic benefits throughout the production chain. Mexico is the world's leading avocado producer, with an annual output of 2,394,000 ton cultivated over 257,570 ha, approximately 7% of which is located at the municipality of Uruapan (January 2024) (SIAP 2025).

Similarly, Mexico is the principal global exporter of avocados, with exports totaling 1,159,000 ton, while the United States stands as the largest importer, receiving 1,117,000 ton (FAOSTAT 2025; SIAP 2025).

Reports of fungal diseases affecting avocado fruits are varied; among the most significant in Mexico are those caused by *Colletotrichum* sp. and *Fusarium* sp. (Trinidad-Angel et al. 2017; Iñiguez-Moreno et al. 2020)

Neofusicoccum is a genus implicated in causing canker diseases on the woody tissues of forest and agriculturally important trees (Swart and Wingfield 1991; Slippers and Wingfield 2007; Sakalidis et al. 2013; Zlatković et al. 2017; Zlatković et al. 2019). Taxonomically, it is classified within the family Botryosphaeriaceae, order Botryosphaerales, Phylum Ascomycota. *Neofusicoccum parvum* (Pennycook and Samuels 1985) is a polyphagous phytopathogen responsible for aggressive, highly aggressive infections in woody tissues across multiple sites. Symptoms include dieback, leaf spots, root and fruit rot, as well as canker formation (Golzar and Burgess 2011; Iturrutxa et al. 2011; Thomidis 2011; Choi et al. 2012; Sakalidis et al. 2013; Lopes et al. 2014; Alberti et al. 2018; Vakalounakis et al. 2019; Manca et al. 2020).

N. parvum has been identified as a significant phytopathogen causing severe disease in a wide range of hosts and plant structures, including fruits (Gezahgne et al. 2003; Gezahgne et al. 2004; Molina-Gayosso 2011).

This study aimed to perform a phytopathological survey of the disease in one of the leading avocado-producing regions of Michoacán, Mexico. The objective was to characterize fruit

rot symptoms and to evaluate the pathogenicity of *Neofusicoccum parvum* through fruit inoculation assays, followed by an assessment of disease severity and virulence.

Materials and methods

Fruit samples were collected from export-certified commercial orchards using a simple random sampling method. The selected fruits appeared healthy and physiologically mature at harvest. A total of 20 fruits were collected from apparently healthy trees in each orchard. Samples were obtained from five different orchards located in distinct municipalities, all of which are part of the world's most important avocado-producing region, known as the "avocado belt" of the state of Michoacán, Mexico.

The orchards were selected based on contrasting agroclimatic conditions and their relevance in terms of planted surface area and production volume. This region is located within the physiographic province of the Trans-Mexican Volcanic Belt, between 18° 45' and 20° 6' North latitude, and 101° 47' and 103° 13' West longitude.

Avocado crops in this area are situated at elevations ranging from 1,100 to 2,900 meters above sea level (masl), with the majority located between 1,600 and 2,100 masl. Most of the crop is established on andosol-type soils (89.81%). The region includes 14 climate types, 10 of which are suitable for avocado cultivation. Average annual temperatures in these areas range from 16°C to 31°C, while annual precipitation varies between 149 mm and 1,500 mm. Relative humidity in the cultivation zones typically reaches up to 90%.

The collected symptomatic fruits were placed to the laboratory for processing. It showed similar characteristics, such as size, shape, and color. Each fruit was individually numbered (1 to 20) and systematically placed in a plastic bag, which was then stored inside a plastic box at 28°C to allow physiological ripening. This setup was designed to facilitate the emergence of latent infections that might not be externally visible at the time of sampling.

When symptoms appeared—mainly black rot—the fruits were processed, and isolations were performed from the affected tissues. Small pieces of rotten pulp were excised and directly placed onto Petri dishes containing PDA (potato dextrose agar) medium. This procedure was repeated for all collected fruits.

Once the fungi were isolated and identified as belonging to the genus *Neofusicoccum*, some strains were selected for further study. Selection criteria included differences in biological traits such as growth rate, colony texture, and overall morphology. Although symptom expression varied slightly among fruits, all consistently exhibited black rot.

The selected isolates originated from five municipalities in Michoacán: Uruapan (U1), Tacámbaro (U2), Tancítaro (U3), Zacapu (U4), and Salvador Escalante (U5).

Pathogenicity Tests

For the fruit assay, fruits were disinfested with 3% NaOCl for 60 s, and subsequently rinsed three times with sterile distilled water to remove potential contaminants from the surface. Each fruit was then divided into four segments of approximately 3 cm in width, which were used for inoculation with mycelial plugs of the fungal pathogen.

Each pathogen isolate (U1 to U5) was cultured on PDA at 25 °C for 7 days. Agar plugs (5 mm in diameter) with actively growing mycelium were excised and placed at the center of each fruit section, and secured with sterile adhesive tape. As a negative control, five fruits divided into four sections was inoculated with sterile agar plugs without mycelium (Barrientos-Martínez et al. 2022).

All inoculated fruits were placed in a plastic humid chamber containing moistened filter paper saturated with sterile distilled water to maintain high humidity. Fruits were incubated at 25 °C for 21 days. Disease severity was evaluated by measuring lesion length. Each replicate consisted of ten fruits, each with four inoculated sections, resulting in a total of forty lesions measured per treatment. The mean lesion length was calculated for severity analysis.

For the whole-plant assay, the pathogen was cultured on PDA at 25 °C for 7 days. Approximately 1 g of fresh mycelium was collected and homogenized in 30 mL of sterile distilled water. The resulting mycelial suspension was applied to six-month-old avocado plants, $\approx$ 25 cm in height. Control plants were treated with sterile distilled water only.

Plants were maintained under high humidity by covering them with transparent plastic bags for 5–8 days at 25 °C. After this period, the bags were removed, and the plants were transferred to another section of the greenhouse with a temperature of 25 ± 1.4 °C.

For pathogenicity test, lesion sizes of each individual lesion were measured on the eighth day after inoculation. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using Origin version 2025b. Significant differences among mean lesion sizes were determined with Tukey's test at a significance threshold of $p = 0.05$.

DNA Extraction, PCR and Sequencing

To confirm the identity of the fungus, total genomic DNA was extracted directly from the mycelia grown on PDA using the 2% CTAB method (Martínez-González et al. 2017). The ITS region and *tef1- α* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer pairs ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') (White et al. 1990), primers EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') (Carbone and Kohn 1999) and TEF1-LLerev (5'-GCCATCCTTGGAGATACCAGC-3') (Jaklitsch et al. 2005), respectively.

The PCR reaction mixture had a final volume of 15 μ L and contained 1 $\times$ Taq DNA polymerase buffer, 0.8 mM dNTPs (0.2 mM of each one), 100 ng of genomic DNA, 20 pmol of each primer and 2 units of GoTaq DNA polymerase (Promega, USA). PCR conditions were performed under the following conditions: an initial denaturation at 94 °C for 3 min, then denaturation at 94 °C for 30 s, annealing for 45 s with the corresponding temperatures (57°C for ITS, and 56°C for *tef1- α*), extension at 72 °C for 1 min, followed by 35 cycles, then a final extension at 72 °C for 10 min, using an Applied Biosystems S1000 TM Thermal Cycler. The amplifications were verified through electrophoresis in an agarose gel at 1.2% prepared with 1 $\times$ TAE buffer (Tris Acetate-EDTA) and run at 87 V cm³ during 1 h. The gel was stained with GelRed (Biotium, USA) and the bands were visualized in an Infinity 3000 transilluminator (Vilber Lourmat, Germany). The amplified products were purified with the ExoSAP Purification kit (Affymetrix, USA), following the manufacturer's instructions. They were quantified and prepared for the sequence reaction using a BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystem). These products were sequenced in both directions with an Applied Biosystem model 3730XL (Applied BioSystems, USA), at the Institute of Biology of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

The consensus sequences of each of the markers were assembled using BioEdit version 7.0.5 (Hall 1999) . These sequences were compared with those deposited in GenBank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the BLASTN 2.2.19 tool (Zhang et al. 2000).

Phylogenetic Analyses

Sequence data retrieved from GenBank based on previous studies are listed in Table 1. The sequences were subjected to standard BLASTn searches (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>) in GenBank to determine the primary identity of the fungal isolates.

Each region was independently aligned using the online version of MAFFT v7 (Kato et al. 2002, 2017; Kato and Standley 2013). The alignments were revised in PhyDE v. 10.0 (Müller et al. 2005), followed by minor manual adjustments to ensure character homology between taxa. The ITS dataset comprised 28 taxa (651 characters); while the *tef1- α* region consisted of 28 taxa (810 characters). Four partition schemes were established: one for the ITS, and three for the *tef1- α* , which were established using the option to minimize the stop codons with Mesquite v3.2 (Maddison and Maddison 2017).

Phylogenetic analyses were conducted using Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI). MP analyses were carried out in PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) using the heuristic search mode, 1000 random starting replicates, and TBR branch swapping, with MULTREES and Collapse on. Bootstrap support was estimated from 1000 replicates under the heuristic search mode, each with 100 random

addition replicates. ML analyses were conducted in RAxML v. 8.2.10 (Lanfear et al. 2014) with a GTR + G substitution model. To assess branch support, 10000 rapid bootstrap replicates were run with the GTR GAMMA model. Bayesian inference was carried out in MrBayes v. 3.2.6 x64 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) with four chains and the best evolutionary model for alignment was sought using PartitionFinder (Frandsen et al. 2015; Lanfear et al. 2014; 2016). Phylogenetic analyses were performed using MrBayes v3.2.6 x64 (Huelsenbeck and Ronquist 2001). The information block for the matrix included two simultaneous runs of Montecarlo chains, temperature set to 0.2 and sampling 10 million generations (standard deviation ≤ 0.1). Chain convergence was visualized in Tracer v.1.6 (Rambaut et al. 2014). The remaining trees were used to calculate a 50% majority-rule consensus topology and posterior probabilities (PP). Trees were visualized and optimized in FigTree v. 1.1.4 (Rambaut 2014), and they edited in Adobe Illustrator (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA).

Results

Phylogenetic analysis

Sequences were submitted to GenBank for assigning accession numbers (Table 1). BLASTn analysis of the sequences indicated that the sequences from the present study matched well with the reliable reference sequences of *Neofusicoccum parvum* and showed 100% sequence similarity in ITS, and 100% in *tef* 1- α gene.

The dataset of combined ITS and *tef* 1- α comprises 28 taxa with 1461 characters including gaps. The three phylogenetic analyses, MP, ML, and BI, of the dataset recovered similar topologies (Fig. 1). No significant conflict (bootstrap value $>80\%$) was detected among the topologies obtained via the separate phylogenetic analyses. The parsimony analysis of the alignment found 1141 trees of 174 steps (CI=0.1945, HI=0.1830, RI=0.2002, RC=0.1624). The best RAxML tree with a final likelihood value of -20378.038624 is presented. The matrix had 925 distinct alignment patterns, with 3.01% undetermined characters or gaps. Estimated base frequencies were as follows: A= 0.106256, C= 0.106834, G= 0.153075, T= 0.103640; substitution rates AC= 1.058315, AG= 1.008411, AT= 1.000051, CG= 1.051375, CT= 3.035687, GT= 1.0573166; gamma distribution shape parameter α = 0.000256. In the Bayesian analysis, the standard deviation between the chains stabilized at 0.002 after 4.3 million generations. No significant changes in tree topology trace or cumulative split frequencies of selected nodes were observed after about 0.31 million generations, which were discarded as 25% burn-in.

The phylogenetic tree which revealed that the present study isolates (UMSNH1-UMSNH5) produced a single clade with the reliable reference strains of *Neofusicoccum parvum* (CMML2001, CMML2003, CMML2004, CBS 123652, CMW 9080 and CERC 3503)

supported by a high bootstrap value and posterior confidence (Fig 1). Combined phylogenetic analysis confirmed the isolate identification as *Neofusicoccum parvum*.

Morphological description:

Sexual morph: *Botryosphaeria parva* Pennycook and Samuels (Pennycook and Samuels 1985), not observed.

Asexual morph: Conidiomata pynidial, aggregated, globose to subglobose, superficial, coated with white hyphae, black, $370\text{--}908 \times 234\text{--}506 \mu\text{m}$ diameter. Conidiophores reduced to conidiogenous cells. Conidiogenous cells phialidic, hyaline, aseptate, densely aggregated. Conidia fusoid, hyaline, aseptate, $18\text{--}25 \times 7.5\text{--}10 \mu\text{m}$ (mean = 20.8×7.9 , n=50 conidias).

Culture characteristics:

Culture on PDA after seven days of incubation at 25 °C: circular colonies with initially superficial mycelium that later becomes aerial; grey to dark in colour, with an entire margin and a cottony appearance, bearing a darker concentric ring. Pycnidia emerge above the superficial mycelium. The reverse side is olivaceous grey to black.

Pathogenicity test

Isolates of *Neofusicoccum parvum* cultured on PDA exhibited rapid aerial mycelial growth, with coloration ranging from white to greyish to black due to conidial production. Conidia measured $18\text{--}25 \times 7.5\text{--}10 \mu\text{m}$ and were produced within subglobose pycnidia measuring $370\text{--}908 \times 234\text{--}506 \mu\text{m}$

For the pathogenicity assays, five strains of *N. parvum* (U1, U2, U3, U4, and U5) were inoculated onto healthy avocado fruits. The fruits were monitored to detect and characterize symptoms and signs on the host tissue. All inoculated fruits consistently produced pathogen growth. By the third day post-inoculation, a noticeable darkening of the tissue was observed, followed by the formation of sunken lesions. In all replicates, greyish mycelium appeared on the exocarp from day three onward

The results demonstrated that the disease was severe and highly virulent across all treatments by the end of the 11-day experimental period. All five *N. parvum* strains exhibited phytopathogenic behavior, inducing very similar symptoms and showing consistent disease progression patterns. Moreover, the symptoms produced on inoculated fruits closely resembled those observed in samples collected from commercial avocado orchards.

All strains were able to colonize both the mesocarp and the endocarp, with more severe disease expression observed in the endocarp. In some cases, particularly with strains U5 and U3, the infection was so aggressive that it reached the seed. Notably, a distinction was observed between the symptoms seen in situ and those from the pathogenicity test: in situ, infection typically began at the upper part of the fruit, near the junction between the peduncle and the fruit. In contrast, the artificially inoculated fruits showed infection originating from various entry points, depending on the site of inoculation.

These observations suggest that this pathogen acts as a facultative necrotroph, it can actively invade intercellular areas or enter through natural openings such as stomata and lenticels, which are part of the fruit's structure. This behavior also highlights the high virulence and disease-causing potential of *N. parvum* on avocado fruits.

All *Neofusicoccum parvum* strains colonized the avocado fruits, leading to progressive tissue degradation. The infection was characterized by soft rot and deterioration of the mesocarp and exocarp. Symptoms became evident on the third day post-inoculation, beginning with the appearance of a brown lesion at the inoculation site—corresponding to the placement of the mycelial plug containing the pathogen (Fig. 3; sections A, B, and K).

By the fifth day, tissue damage had significantly progressed. The pulp (endocarp) developed pronounced depressions at the lesion site, and in certain cases, fragmentation and detachment of affected tissue were observed. This was the result of symptom coalescence in both the exocarp and mesocarp due to pathogen activity (Fig. 3; sections C, G, and H). In some instances, fragments of the epidermis remained adhered to remnants of the pulp, a condition attributed to the severity of the infection, particularly between the ninth and eleventh day post-inoculation (Fig. 3; sections E, F, L, M, N, and Ñ).

In contrast, fruits used as negative controls remained asymptomatic throughout the experimental period, showing no signs of infection by the end of the trial (Fig. 3; sections Q and R).

The severity of the disease caused by *Neofusicoccum parvum* on avocado fruits was evaluated up to the eleventh day post-inoculation. Between the third and eleventh day, the strains exhibited disease severity levels spanning the entire range of the logarithmic diagrammatic scale for 'Hass' avocado fruits, as adapted by Silva-Rojas et al. (2011).

Analysis of variance (ANOVA) was conducted on severity data collected on the eighth day post-inoculation, since beyond this point some lesions became too severe to accurately measure lesion diameter. Significant differences in virulence were observed among the strains ($p \leq 0.05$), except between strains U1 and U2 (Fig. 4), which showed very similar effects throughout the 11-day inoculation period (Fig. 5). Strain U3 demonstrated the greatest ability to induce the most severe symptoms during the entire evaluation period. A total of 99% of the inoculated fruits developed disease symptoms compared to the control fruits.

Strains 3 and 5 showed lesions as early as the third day post-inoculation, while the remaining strains exhibited lesions starting on the fourth day (Fig. 5). Strains 1 and 2 displayed very similar lesion progression during the first nine days of inoculation (Fig. 4).

Strain U3 was highly virulent, and from the ninth day onward, lesion severity could not be measured due to extensive tissue damage.

Discusión

In this study, five isolates of *Neofusicoccum parvum*, the causal agent of black rot in avocado fruit, were analyzed. These isolates were collected from one of the most important avocado-producing regions of Michoacán, Mexico, and their pathogenicity was evaluated on *Persea americana* var. Hass seedlings. Morphologically, the fungus was consistent with previous descriptions of *N. parvum* by Molina-Gayosso et al. (2012). *N. parvum* has a cosmopolitan distribution and has been reported infecting a wide range of All strains were able to colonize both the mesocarp and the endocarp, with more severe disease expression observed in the endocarp. In some cases, particularly with strains U5 and U3, the infection was so aggressive that it reached the seed. Notably, a distinction was observed between the symptoms seen in situ and those from the pathogenicity test: in situ, infection typically began at the upper part of the fruit, near the junction between the peduncle and the fruit. In contrast, the artificially inoculated fruits showed infection originating from various entry points, depending on the site of inoculation.

These observations suggest that this pathogen acts as a facultative necrotroph, it can actively invade intercellular areas or enter through natural openings such as stomata and lenticels, which are part of the fruit's structure. This behavior also highlights the high virulence and disease-causing potential of *N. parvum* on avocado fruits.

All *Neofusicoccum parvum* strains colonized the avocado fruits, leading to progressive tissue degradation. The infection was characterized by soft rot and deterioration of the mesocarp and exocarp. Symptoms became evident on the third day post-inoculation, beginning with the appearance of a brown lesion at the inoculation site—corresponding to the placement of the mycelial plug containing the pathogen (Fig. 3; sections A, B, and K).

By the fifth day, tissue damage had significantly progressed. The pulp (endocarp) developed pronounced depressions at the lesion site, and in certain cases, fragmentation and detachment of affected tissue were observed. This was the result of symptom coalescence in both the exocarp and mesocarp due to pathogen activity (Fig. 3; sections C, G, and H). In some instances, fragments of the epidermis remained adhered to remnants of the pulp, a condition attributed to the severity of the infection, particularly between the ninth and eleventh day post-inoculation (Fig. 3; sections E, F, L, M, N, and Ñ).

In contrast, fruits used as negative controls remained asymptomatic throughout the experimental period, showing no signs of infection by the end of the trial (Fig. 3; sections Q and R).

The severity of the disease caused by *Neofusicoccum parvum* on avocado fruits was evaluated up to the eleventh day post-inoculation. Between the third and eleventh day, the strains exhibited disease severity levels spanning the entire range of the logarithmic diagrammatic scale for 'Hass' avocado fruits, as adapted by Silva-Rojas et al. (2011).

Analysis of variance (ANOVA) was conducted on severity data collected on the eighth day post-inoculation, since beyond this point some lesions became too severe to accurately measure lesion diameter. Significant differences in virulence were observed among the strains ($p \leq 0.05$), except between strains U1 and U2 (Fig. 4), which showed very similar effects throughout the 11-day inoculation period (Fig. 5). Strain U3 demonstrated the greatest ability to induce the most severe symptoms during the entire evaluation period. A total of 99% of the inoculated fruits developed disease symptoms compared to the control fruits.

Strains 3 and 5 showed lesions as early as the third day post-inoculation, while the remaining strains exhibited lesions starting on the fourth day (Fig. 5). Strains 1 and 2 displayed very similar lesion progression during the first nine days of inoculation (Fig. 4).

Strain U3 was highly virulent, and from the ninth day onward, lesion severity could not be measured due to extensive tissue damage.

Discusión

In this study, five isolates of *Neofusicoccum parvum*, the causal agent of black rot in avocado fruit, were analyzed. These isolates were collected from one of the most important avocado-producing regions of Michoacán, Mexico, and their pathogenicity was evaluated on *Persea americana* var. Hass seedlings. Morphologically, the fungus was consistent with previous descriptions of *N. parvum* by Molina-Gayosso et al. (2012). *N. parvum* has a cosmopolitan distribution and has been reported infecting a wide range of hosts, *oxysporum* f. sp. *lycopersici* can overcome resistance in tomato varieties carrying the I-2 gene, demonstrating the importance of races in plant–pathogen interactions.

Host variety, fruit maturity stage, and environmental conditions during pathogenicity testing can also influence symptom expression, even with the same causal agent. In inoculation experiments on apples, Hu et al. (2024) found that the virulence of *Fusarium acuminatum* and *Alternaria alternata* varied significantly with the fruit variety, with notable differences in symptom onset and lesion size. Although these belong to different genera, the authors also noted that within *Fusarium*, variations in the aggressiveness of isolates on different apple cultivars have been reported, possibly due to epigenetic or microenvironmental differences (Hu et al. 2024).

This phenomenon is particularly relevant in the epidemiology of postharvest diseases, where species-level identification by itself may not be sufficient to predict disease severity. As emphasized by Baroncelli et al. (2017), differences in pathogenicity observed among isolates within the same *Colletotrichum* species complex demonstrate that taxonomic classification does not always reflect the biological behavior or phytosanitary risk of the pathogen.

In summary, these findings underscore the importance of considering intraspecific variability in pathogenicity studies, especially in fruit assays where multiple factors interact to determine the final outcome of infection.

References

- Adesemoye, A. O., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Twizeyimana, M., Lynch, S. C., & Eskalen, A. (2014). Identification of species of Botryosphaeriaceae causing Bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease*, 98(1), 55–61. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0492-RE>
- Agrios GN (2005) *Plant pathology* (5th ed.). Academic Press.
- Alberti I, Prodi A, Nipoti P, Grassi G (2018) First report of *Neofusicoccum parvum* causing stem and branch canker on *Cannabis Sativa* in Italy. *J Plant Dis Prot* 125:511–513. <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0174-4>
- Ashworth V, Rolshausen P (2025) *Avocado Cultivars, Botanical Races and Genetic Footprints*. Available online: <https://ucanr.edu/blogs/blogcore/postdetail.cfm?postnum=21125>. Accessed 26 April 2025.
- Ayala-Armenta QA, Tovar-Pedraza JM, Apodaca-Sánchez MA, Correia KC, Saucedo-Acosta CP, Camacho-Tapia M, Beltrán-Peña H (2021) First report of *Colletotrichum jiangxiense* causing avocado anthracnose in Mexico. *Plant Disease* 105(2): 502. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0926-PDN>
- Baroncelli R, Talhinas P, Pensec F, Sukno SA, Martins N, Di Pietro A (2017) Host range and infection strategies in *Colletotrichum*: A genomics perspective. *Mol Plant Pathol* 18(6):996–1008. <https://doi.org/10.1111/mpp.12448>
- Barrientos-Martínez A, Mir SL, Hernández MV, Tapia MC, Ochoa SA, Acuayte-Valdés E, Barrientos-Priego AF (2022) Pruebas de patogenicidad de hongos en plantas de aguacate ‘Hass’ relacionados a complejos ambrosiales. *Trop Subtrop Agroecosyst* 25(2022), 041-041. <https://doi.org/10.56369/tsaes.3727>

- Bertetti, D., Giovanna, G., Morlino, M., Pugliese, M., & Garibaldi, A. (2025). First Report of leaf spots caused by *Diaporthe* spp. on *Viburnum opulus* in Italy. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-25-0706-PDN>
- Boyzo-Marín, J, Rebollar-Alviter, Á, Silva-Rojas, HV, & Ramírez-Maldonado, G. (2016). First report of *Neofusicoccum parvum* causing stem blight and dieback of blueberry in Mexico. *Plant Disease*, 100(12), 2524. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0381-PDN>
- Carbone I, Kohn LM (1999) A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3):553-556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Chacón, JL, Gramaje, D, Izquierdo, PM, Martínez, J, & Mena, A (2020). Evaluation of six red grapevine cultivars inoculated with *Neofusicoccum parvum*. *European Journal of Plant Pathology*, 158(3), 811–815. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02111-9>
- Chen, SF, Morgan, DP, Hasey, JK, Anderson, K, & Michailides, TJ (2014). Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English walnut in California. *Plant Disease*, 98(5), 636–652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>
- Cheng FW, Ford NA, Taylor MK (2021) US older adults that consume avocado or guacamole have better cognition than non-consumers: National Health and Nutrition Examination Survey 2011–2014. *Front Nutr* 8:746453. <http://doi.org/10.3389/fnut.2021.746453>
- Choi IY, Sharma PK, Cheong SS (2012) First report of *Neofusicoccum parvum* associated with bark dieback of blueberry in Korea. *Plant Pathol J* 28(2):217-217. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.DR.01.2011.0011>
- Correll JC, Morelock, TE, Black MC, Koike ST, Bruton BD (1987) Identification of a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato. *Plant Disease* 71(6):590–593. <https://doi.org/10.1094/PD-71-0590>
- Edwards CG, Walk AM, Thompson SV, Reeser GE, Erdman JJW, Burd NA, Holscher HD, Khan NA (2020). Effects of 12-week avocado consumption on cognitive function among adults with overweight and obesity. *Int J Psychophysiol* 148:13-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2019.12.006>
- Espinoza, JG, Briceño, EX, Keith, LM, & Latorre, BA (2008). Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease*, 92(10), 1407–1414. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1407>.
- FAOSTAT Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agriculture. <https://www.fao.org/faostat/en/#home>. Accessed 26 April 2025.

- Fiorenza A, Gusella G, Vecchio L, Aiello D, Polizzi G (2023) Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with canker and dieback of avocado (*Persea americana*) in Italy. *Phytopathol Mediterr* 62(1):47-63.
- Frandsen PB, Calcott B, Mayer C, Lanfear R, (2015) Automatic selection of partitioning schemes for phylogenetic analyses using iterative k-means clustering of site rates. *BMC Evol Biol* 15:1–13 <http://doi.org/10.1186/s12862-015-0283-7>
- Gan P, Ikeda K, Irieda H, Narusaka M, O'Connell RJ, Narusaka Y, Takano Y, Kubo Y, Shirasu K (2016) Comparative genomic and transcriptomic analyses of the *Colletotrichum* species complex reveal divergent lifestyles and pathogenic strategies. *BMC Genomics* 17:957. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3290-x>
- Gezahgne A, Roux J, Slippers B, Wingfield MJ (2004) Identification of the causal agent of Botryosphaeria stem canker in Ethiopian Eucalyptus plantations. *S Afri J Bot* 70(2):241-248. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30241-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30241-6)
- Gezahgne A, Roux J, Wingfield MJ (2003) Diseases of exotic plantation Eucalyptus and Pinus species in Ethiopia. *S Afr J Sci* 99:29–33.
- Golzar H, Burgess TI (2011) *Neofusicoccum parvum*, a causal agent associated with cankers and decline of Norfolk Island pine in Australia. *Australas Plant Pathol* 40(5):484–489. <https://doi.org/10.1007/s13313-011-0068-4>
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41(41):95–98.
- Henning SM, Guzman JB, Thames G, Yang J, Tseng CH, Heber D, Kim J, Li Z (2022) Avocado Consumption Increased Skin Elasticity and Firmness in Women—A Pilot Study. *J Cosmet Dermatol* 21:4028–4034. <https://doi.org/10.1111/jocd.14717>
- Hernández D, García-Pérez O, Perera S, González-Carracedo MA, Rodríguez-Pérez A, Siverio F (2023) Fungal pathogens associated with aerial symptoms of avocado (*Persea americana* Mill.) in Tenerife (Canary Islands, Spain) focused on species of the family Botryosphaeriaceae. *Microorganisms* 11(3):585. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030585>
- Herrera-González, JA. Ramos-Bell, S, Bautista-Baños, S, Velázquez-Estrada, RM, Rayón-Díaz, E, Martínez-Batista, E, & Gutiérrez-Martínez, P. (2024). Chitosan and GRAS Substances: An Alternative for the Control of *Neofusicoccum parvum* In Vitro, Elicitor and Maintenance of the Postharvest Quality of Avocado Fruits. *Horticulturae*, 10(7), 687. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10070687>

- Hu X, Zhang Z, Liu C, Chen L (2024) First report of apple black spot caused by *Fusarium acuminatum* and *Alternaria alternata* in China. *Front Microbiol* 15:1457315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1457315>
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* (Oxford, England), 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Ibarra-Laclette E, Méndez-Bravo A, Pérez-Torres CA, Albert VA, Mockaitis K, Kilaru A, López GR, Cervantes LJI, Herrera-Estrella L (2015) Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC genomics* 16(1): 599. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1775-y>
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PloS One*, 6(12), e28341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341>
- Iñiguez-Moreno M, González-Gutiérrez KN, Ragazzo-Sánchez JA, Narváez-Zapata JA, Sandoval-Contreras T, Calderón-Santoyo M, (2020) Morphological and molecular identification of the causal agents of post-harvest diseases in avocado fruit, and potential biocontrol with *Meyerozyma caribbica*. *Arch Phytopathol Plant Prot* 54(7-8):411-430. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1834806>
- Iturrutxa E, Slippers B, Mesanza N, Wingfield MJ (2011) First report of *Neofusicoccum parvum* causing canker and die-back of *Eucalyptus* in Spain. *Australas Plant Dis Notes* 6(1):57-59. <https://doi.org/10.1007/s13314-011-0019-5>
- Jaklitsch WM, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS (2005) *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea*/*Trichoderma*. *Mycologia*, 97(6):1365-1378. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832743>
- Kaliternam, J., Milicevic, T., Bencic, D., & Duralija, B. (2013). First report of *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine trunk diseases in Croatia. *Plant Disease*, 97(12), 1656. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0283-PDN>
- Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30(14):3059-3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinformatics* 20(4):1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30(4):772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kim HT, Kim YJ, Kim SH, Cho JH, Choi GJ (2021) Symptom variations and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing apple anthracnose in Korea. *The Plant Pathol J* 37(6):627–635. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2021.0106>
- Lanfear R, Calcott B, Kainer D, Mayer C, Stamatakis A (2014) Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. *BMC Evol Biol* 14(1):82. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-82>
- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T, Calcott B (2017) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol Biol Evol* 34(3):772-773. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
- Lopes UP, Zambolim L, Pinho DB, Barros AV, Costa H, Pereira OL. (2014) Postharvest rot and mummification of strawberry fruits caused by *Neofusicoccum parvum* and *N. kwambonambiense* in Brazil. *Trop Plant Pathol* 39:178-183. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000200009>
- Lopes, UP, Dias, MC, da Silva, DM, dos Santos, DS. Do Prado, P., & Zambolim, L. (2014). Postharvest rot and mummification of strawberry fruits caused by *Neofusicoccum parvum* and *N. kwambonambiense* in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39(4), 221-229. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000400003>
- Maddison W, Maddison D (2017) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.31. Available from: <http://mesquiteproject.org> Accessed 3 Nov 2022.
- Manca D, Bregant C, Maddau L, Pinna C, Montecchio L, Linaldeddu B (2020) First report of canker and dieback caused by *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia olivarium* on oleaster in Italy. *Ital J Mycol* 49:85-91. <https://doi.org/10.6092/issn.2531-7342/11048>
- Martínez-González CR, Ramírez-Mendoza R, Jiménez-Ramírez J, Gallegos-Vázquez C, Luna-Vega I (2017) Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods* 13:1–10. <http://doi.org/10.1186/s13007-017-0234-y>
- McDonald, V., & Eskalen, A. (2011). *Botryosphaeriaceae* species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Disease*, 95(11), 1465–1473. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0136>
- McDonald, V., Lynch, S., & Eskalen, A. (2009). First Report of *Neofusicoccum australe*, *N. luteum*, and *N. parvum* Associated With Avocado Branch Canker in California. *Plant Disease*, 93(9), 967. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0967B>

- Molina-Gayosso E, Silva-Rojas HV, García-Morales S, Avila-Quezada G (2012) First Report of Black Spots on Avocado Fruit Caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. *Plant Disease* 96(2):287. <https://doi.org/10.1094/pdis-08-11-0699>
- Müller K, Quandt D, Müller J, Neinhuis C (2005) PhyDE®-Phylogenetic data editor. Program distributed by the authors, version 10.0. Available from: <https://www.phyde.de>. Accessed 3 November 2022
- Pedreschi R, Uarrota V, Fuentealba C, Alvaro JE, Olmedo P, Defilippi BG, Meneses C, Campos-Vargas R (2019) Primary Metabolism in Avocado Fruit. *Front Plant Sci* 10:795. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00795>
- Pennycook SR, Samuels GJ (1985) *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon* 24:445–458.
- Puig, AS, Keith, LM, Matsumoto, TK, Gutierrez, OA, & Marelli, JP. (2021). Virulence tests of *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Phytophthora palmivora* on *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology*, 159, 851–862. DOI: 10.1007/s10658-021-02210-1.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ (2014) Tracer v1.6. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> Accessed 3 November 2020
- Ren Q, Wu D, Wu C, Wang Z, Jiao J, Jiang B, Zhu J, Huang Y, Li T, Yuan W (2020) Modeling the potential distribution of *Machilus thunbergii* under the climate change patterns in China. *Open J Form* 10:217–231. <https://doi.org/10.4236/ojf.2020.102015>
- Riccioni, L, Valente, M. T., & Di Giambattista, G. (2017). First report of *Neofusicoccum parvum* causing shoot blight and plant decay on pomegranate in Tarquinia, Italy. *Journal of Plant Pathology*, 99(1), 294. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i1.3805>
- Rusin, C, Droby, S, Wisniewski, M, Casieri, L, & Lima, G (2019). Potential of *Aureobasidium pullulans* strains L1 and L8 to control *Neofusicoccum parvum*, the causal agent of apple fruit rot. *Biological Control*, 137, 104005. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104005>
- Sakalidis ML, Slippers B, Wingfield BD, Hardy GSJ, Burgess TI (2013) The Challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: Global populations of the *Neofusicoccum parvum*-*N. ribis* species complex. *Divers Distrib* 19:873–883. <https://doi.org/10.1111/ddi.12030>
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Datos y reporte de producción agrícola aguacate. <https://www.gob.mx/siap>. Accessed 05 de Agosto de 2024

- Silva-Rojas HV, Ávila-Quezada GD (2011) Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathol* 60(5):899–908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x>
- Slippers B, Wingfield MJ (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. *Fungal Biol Rev* 21(2-3):90–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Slippers, B., Stenlid, J., & Wingfield, M. J. (2005). Emerging pathogens: fungal host jumps following anthropogenic introduction. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(8), 420–421. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.05.002>
- Swart WJ, Wingfield MJ (1991) Biology and control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Africa. *Plant Disease* 75:761–766.
- Takushi, T., Ajitomi, A., Arasaki, C., Ooshiro, A., & Sato, T. (2017). Stem-end rot of mango (*Mangifera indica*) caused by *Neofusicoccum parvum* in Japan. *Nihon Shokubutsu Byori Gakkaiho* [Annals of the Phytopathological Society of Japan], 83(2), 102–106. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.83.102>
- Thomidis T, Michailides TJ, Exadaktylou E (2011) *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *Eur J Plant Pathol* 131:661–668. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9840-0>
- Thompson SV, Bailey MA, Taylor AM, Kaczmarek JL, Mysonhimer AR, Edwards CG, Reeser GE, Burd NA, Khan NA, Holscher HD (2021) Avocado consumption alters gastrointestinal bacteria abundance and microbial metabolite concentrations among adults with overweight or obesity: A randomized controlled trial. *J Nutr* 151: 753–762. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa219>
- Trinidad-Ángel, E, Ascencio-Valle, F de J, Ulloa, J. A., Ramírez-Ramírez, JC, Ragazzo-Sánchez, JA, Calderón-Santoyo, M, & Bautista-Rosales, PU (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(Especial 19), 3953–3964. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>
- Úrbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. (2009). Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 93(6), 584–592. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0584>
- Vakalounakis DJ, Ntougias S, Kavroulakis N, Protopapadakis E (2019) *Neofusicoccum parvum* and *Diaporthe foeniculina* associated with twig and shoot blight and branch canker of citrus in Greece. *J Phytopathol* 167:527–537. <https://doi.org/10.1111/jph.12843>

- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, White T (ed) PCR Protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, pp 315–322
- Wu ZY, Raven PH, Hong DY (2008) Eds. Missouri Botanical Garden Press: St. Louis, MO, USA.
- Zarattini M, Farjad M, Launay A, Cannella D, Soulié MC, Bernacchia G, Fagard M (2021) Every cloud has a silver lining: how abiotic stresses affect gene expression in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* 72(4):1020-1033. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa531>
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7(1-2):203–214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
- Zhang, M., Pan, X., Jung, W., Halpern, A. R., Eichhorn, S. W., Lei, Z., Cohen, L., Smith, K. A., Tasic, B., Yao, Z., Zeng, H., & Zhuang, X. (2023). Molecularly defined and spatially resolved cell atlas of the whole mouse brain. *Nature*, 624(7991), 343–354. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06808-9>
- Zlatković M, Keča N, Wingfield MJ, Jami F, Slippers B (2017) New and surprising host associations of *Diplodia sapinea* in the Western Balkans. *For Pathol* 47:e12328. <https://doi.org/10.1111/efp.12491>
- Zlatković M, Wingfield MJ, Jami F, Slippers B. (2019) Genetic uniformity characterizes the invasive spread of *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia sapinea* in the Western Balkans. *For Path* 49(1):e12491. <https://doi.org/10.1111/efp.12491>

ab. 1 Strain information and GenBank accession numbers of sequences used for phylogenetic analyses

Species	Strains	Origin	GenBank Accession Number	
			ITS	<i>tef 1-α</i>
<i>Neofusicoccum andinum</i>	CBS 117921	Venezuela	KX464152	KX464647
<i>Neofusicoccum buxi</i>	CBS 113714	Sweden	KX464164	KX464677
<i>Neofusicoccum cordaticola</i>	CMW 14124	South Africa	EU821925	EU821895
<i>Neofusicoccum cryptoaustrale</i>	CMW 23785 Type	South Africa	NR137718	FJ752713
<i>Neofusicoccum hongkongense</i>	CERC 2973 Type	China	KX278052	KX278157
<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i>	CSF 6037	China	MT028610	MT028776
<i>Neofusicoccum macroclavatum</i>	CBS 114149	Australia	KX464174	KX464694
<i>Neofusicoccum mangroviorum</i>	CMW 41365 Type	South Africa	NR147360	KP860702
<i>Neofusicoccum occulatum</i>	CBS 128008 Type	Australia	MH864743	EU339509
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMML2001	Korea	MW142215	MW142216
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMML2003	Korea	MW535296	MW535298
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMML2004	Korea	MW535297	MW535299
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CBS 123652	South Africa	KX464184	KX464710
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMW 9080	New Zealand	AY236942	AY236887
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CERC 3503	China	KX278059	KX278164
<i>Neofusicoccum parvum</i>	UMSNH 1	Mexico	PV563080	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	UMSNH 2	Mexico	PV563081	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	UMSNH 3	Mexico	PV563082	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	UMSNH 4	Mexico	PV563083	
<i>Neofusicoccum parvum</i>	UMSNH 5	Mexico	PV563084	
<i>Neofusicoccum pistaciarum</i>	CBS 113083 Type	USA	NR147367	KX464712
<i>Neofusicoccum sinoeucalypti</i>	CERC 2005	China	KX278061	KX278166
<i>Neofusicoccum stellenboschiana</i>	CBS 28270	Spain	KX464225	KX464758
<i>Neofusicoccum terminaliae</i>	CBS 125264	South Africa	GQ471805	GQ471783
<i>Neofusicoccum umdonicola</i>	CBS 123644	South Africa	KX464226	KX464759
<i>Neofusicoccum ursorum</i>	CBS 122812	South Africa	KX464227	KX464760
<i>Neofusicoccum viticlavatum</i>	CBS 123532	South Africa	KX464228	KX464761
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS 110302	Portugal	EU673174	AY573218

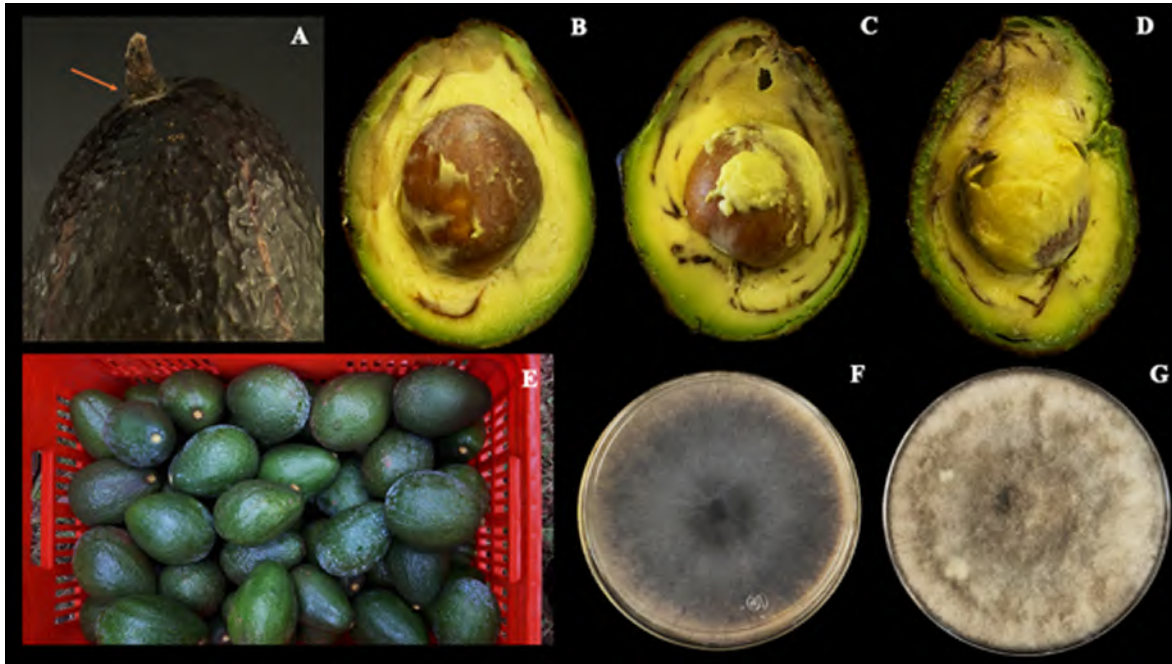


Fig. 2 Symptoms in avocado fruits (*Persea americana*), var. Hass. **A)** External symptoms of avocado fruit rot associated with *N. parvum*, showing the pathogen's sign (mycelium) at the peduncle junction and a change in exocarp coloration toward necrotic tones. **B, C, D)** Cross-sections of avocado fruits at different stages of infection, from initial to advanced, showing progressive changes in endocarp color and texture toward necrosis. **E)** Apparently healthy fruits observed in situ. **F)** Front and reverse sides of the *N. parvum* strain grown on PDA culture medium

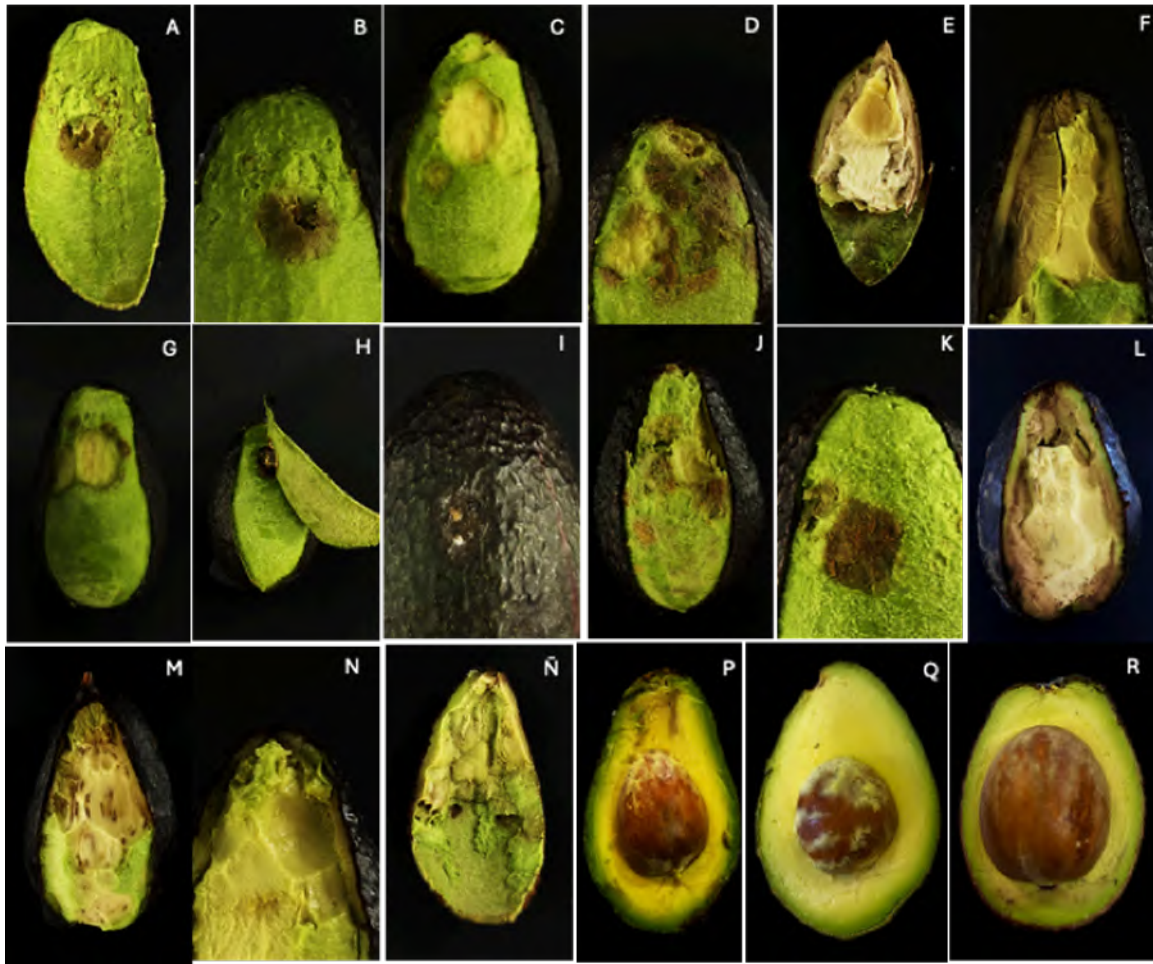


Fig. 3 Pathogenicity tests on detached avocado fruits inoculated with different *N. parvum* strains: **A, B)** A brown halo is visible beneath the epidermis, corresponding to the area affected by the inoculated mycelial disc. **C)** Sunken lesions in the pulp with detached fragments. **D)** Brown lesions scattered throughout the pulp. **E)** Epidermal fragments combined with adherent pulp residues, reflecting severe infection. **F)** Marked damage with incomplete pulp and dull discoloration due to enzymatic degradation by the pathogen. **G)** Sunken lesion in the pulp caused by tissue detachment. **H)** Epidermis remains attached to the pulp only at the inoculation site. **I)** Sunken lesion in the epidermis with darker pigmentation and small white mycelial colonies. **J)** Brown spots scattered across the pulp, accompanied by sunken pulp areas. **K)** Well-defined brown spot in the pulp at the inoculation site. **L)** Incomplete pulp with pronounced damage and darkened tones. **M)** Pulp fragment detachment and necrosis of vascular tissues. **N)** Similar damage to M, but without vascular bundle necrosis. **Ñ)** Epidermal fragment with adherent pulp residues. **P)** Cross-section showing pulp damage in the upper zone and tissue necrosis. **Q, R)** Cross-sections of control fruits with no visible symptoms

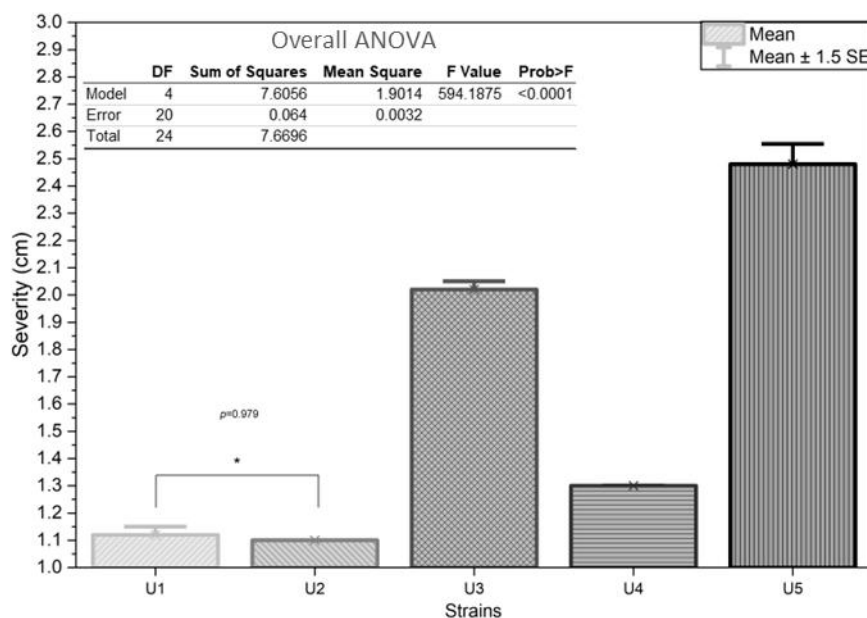


Fig. 4 Disease severity on avocado inoculated with different strains of *N. parvum*. Sererity was expressed as centimeters (cm) of symptomatic fruits measured 8 days after inoculation. Bars represent the standard error of the mean (SEM). * Solely in the strains U1 and U2 means is not significant al the 0.05 level

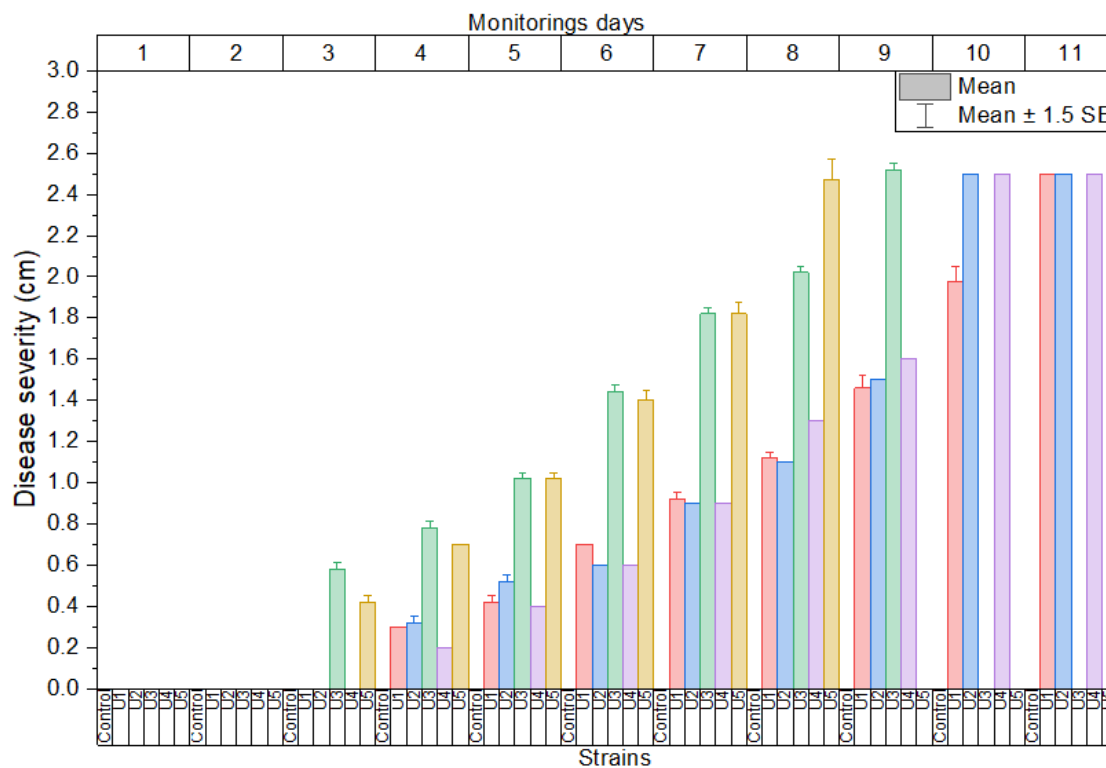


Fig 5 Daily monitoring of the evolution of severity in avocado fruits inoculated with *N. parvum* for 11 days

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de la presente investigación se centró en la identificación de especies fitopatógenas para comprender su biología para poderlos caracterizar y conocer la biodiversidad de especies presentes en los diferentes ecosistemas de nuestros bosques, posteriormente diseñar estrategias de control para la conservación y manejo de los recursos naturales, en el caso de especies vegetales como *Persea americana* var. Hass y Mendez que ocupan una superficie considerable y que a su vez es el factor principal de cambio de uso de suelo y la deforestación. Para lo cual lleve a cabo una serie de muestreos en las zonas más importantes.

En el primer capítulo encontramos información muy relevante a nivel internacional y en México, la familia Botryosphaeriaceae ha sido motivo de investigación porque dentro de sus miembros hay una cantidad considerable de fitopatógenos que afectan principalmente madera de especies forestales y frutícolas, como es el caso del cultivo de aguacate (*Persea americana*, Mill), dado el síndrome existen reportes de infecciones en todas las etapas fenológicas de desarrollo que van desde la germinación de la semilla hasta la fructificación e inclusive en poscosecha.

Uno de los géneros con mayor importancia y el más estudiado es *Lasiodiplodia theobromae*, asociado a muerte regresiva, canchales de ramas y pudrición de fruto, es conocido por ser uno de los principales problemas en huertos maduros de varios años (Alvarado-Rosales et al., 2008; Tovar-Pedraza et al., 2012). Diversos estudios han señalado que estas especies presentan un comportamiento endofítico-latente, activándose bajo condiciones de estrés hídrico, térmico o de manejo, lo que explica su alta incidencia tras sequías, podas intensas o heridas mecánicas (Slippers & Wingfield, 2007; Úrbez-Torres, 2011). Este rasgo ha complicado su manejo, ya que los árboles aparentemente sanos pueden albergar al patógeno sin mostrar síntomas hasta que ocurre un evento de debilitamiento fisiológico.

Las investigaciones recientes resaltan la necesidad de combinar la identificación morfológica con análisis multilocus (ITS, LSU, *tef1- α* , *tub2*) y filogenéticos, para distinguir especies crípticas, ya que varias de ellas producen síntomas similares en fruto y madera (Zhang et al., 2023). En México, las evaluaciones locales han sido limitadas, lo que sugiere un subdiagnóstico de la diversidad real de Botryosphaeriaceae en huertas de Michoacán y otros estados productores.

Actualmente, la discusión sobre su manejo gira en torno a la prevención más que al control químico, privilegiando estrategias como la producción de planta sana en vivero, la desinfección de herramientas, el sellado de heridas de poda y la reducción del estrés del arbolado (Mehl et al., 2017). En este sentido, el estado actual de la familia Botryosphaeriaceae en aguacate en México puede definirse por: presencia confirmada de especies fitopatógenas, impacto económico creciente por pérdidas en fruto y madera, y la urgencia de fortalecer la vigilancia epidemiológica y la investigación aplicada en manejo integrado.

En el segundo capítulo se llevó a cabo la confirmación reciente de *Trametes hirsuta* como agente causal de pudrición blanca en aguacate que ha generado un nuevo panorama en la fitopatología de este cultivo. Además, estos resultados demuestran que un hongo tradicionalmente considerado saprófito puede comportarse como patógeno primario en condiciones de estrés ambiental y manejo inadecuado.

Este hallazgo se conecta con antecedentes en otros frutales y especies leñosas, donde *T. hirsuta* se ha descrito como un hongo de pudrición blanca. Por ejemplo, el Manual de Arboricultura de la Universidad de Washington indica que “*Trametes hirsuta* produce pudriciones blancas en ramas y troncos, debilitando la estructura de los árboles” (University of Washington, 2020). De igual manera, se ha documentado que “esta especie se comporta como un patógeno de madera en árboles frutales y ornamentales de clima templado, ocasionando decaimiento progresivo” (Kirk et al., 2008).

En el caso del cultivo de aguacate, esta evidencia resulta crítica porque refuerza la hipótesis de que los basidiomicetos ligninolíticos no deben subestimarse en sistemas agrícolas tropicales y subtropicales. El propio estudio subraya que “la actividad de enzimas ligninolíticas (lacasas y peroxidasas) de *T. hirsuta* explica la rápida degradación de la madera observada en campo”. Estas características representan una amenaza tanto para la longevidad de los árboles y para la estabilidad productiva de las huertas en regiones como Michoacán, principal zona productora de aguacate a nivel mundial.

Por lo tanto, la discusión actual no solo reconoce a *T. hirsuta* como un nuevo fitopatógeno del aguacate, sino que también exige replantear estrategias de manejo. El control debería orientarse a la prevención, priorizar la desinfección de herramientas, el sellado de heridas de poda y la reducción de factores de estrés en los árboles. Por lo tanto, implementar alternativas de manejo, como el uso de hongos micofagos como *Trichoderma* spp., han mostrado inhibición significativa del crecimiento de *T. hirsuta*, lo que abre una vía prometedora hacia programas de manejo integrado.

En el tercer capítulo abordamos las enfermedades de frutos de aguacate ya que representan un factor limitante muy importante para la producción y comercialización, ya que impactan directamente en la calidad y vida de anaquel. Como señalan Everett et al. (2010), él menciona que los frutos de aguacate son altamente susceptibles a infecciones latentes que se expresan durante la poscosecha, lo que genera pérdidas económicas significativas.

En México, uno de los principales problemas es la antracnosis, causada por especies del género *Colletotrichum*, Esta enfermedad se manifiesta con lesiones necróticas y hundidas en la epidermis del fruto. Según Silva-Rojas y Ávila-Quezada (2011), “la identificación de *Colletotrichum boninense* como un nuevo agente de antracnosis en aguacate demuestra la complejidad del complejo etiológico y la necesidad de diagnósticos más precisos para la identificación de fitopatógenos. Este hallazgo evidencia que el espectro de fitopatógenos asociados al fruto sigue ampliándose. Otro grupo de gran relevancia corresponde a la familia Botryosphaeriaceae. Los géneros *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum* y *Diplodia* ocasionan pudriciones pedunculares (o también conocida como stem-end rot). De acuerdo con Slippers

y Wingfield (2007), estas especies pueden permanecer como endófitos asintomáticos y expresarse como patógenos destructivos bajo condiciones de estrés. Esto explica por qué huertas aparentemente sanas pueden originar lotes con pudrición en poscosecha.

Además, en los últimos años se han documentado patógenos emergentes. Garrido et al. (2019) subrayan que “nuevos hongos como *Alternaria*, *Fusarium* y *Phomopsis* han sido identificados en frutos de aguacate, lo que representa un riesgo adicional para la calidad del producto en poscosecha. Aunque su incidencia es variable, confirman que el complejo patogénico del aguacate es dinámico.

El principal aporte en este capítulo fue la caracterización patogénica del hongo asociado a la pudrición de fruto y a pesar de ya existir un reporte de *Neofusicoccum parvum* (Silva-Rojas, & Ávila-Quezada, 2011), la información fue publicada a través de una nota científica la cual no presentaba información detallada para poderlo identificar en campo y en poscosecha ya que existen varios reportes de fitopatógenos en fruto causantes de pudriciones como los reportados por Lopez-Lopez et al. (2023), en donde no solo reportaron una especie de *Fusarium*, sino también dos miembros de la familia Diaporthaceae (*Phomopsis perseae* y *Diaporthe* sp.), lo que destaca la importancia de este tipo de investigación para comprender los hábitos alimenticios de los diferentes fitopatógenos y conocer la vasta biodiversidad de especies presentes en los ecosistemas. En síntesis, las enfermedades de fruto en aguacate resultan de un complejo patogénico diverso. El reto para México y otros países productores es integrar estrategias de manejo que incluyan diagnóstico molecular como fue el caso de nuestra investigación, monitoreo en huertas y prácticas poscosecha sostenibles, con el fin de reducir pérdidas y garantizar competitividad en los mercados internacionales.

De los tres capítulos podemos observar que aún hay muchos hongos fitopatógenos causantes de enfermedades importantes en las especies vegetales, en los diferentes órganos. Los resultados de esta tesis confirman la importancia de incorporar las diferentes técnicas de identificación tanto morfológica como molecular y la caracterización patogénica la cual nos sirve para comprender los hábitos alimenticios de los diferentes fitopatógenos lo que nos resulta una herramienta útil para diseñar medidas de control y prevención en el manejo de los recursos naturales.

Bibliografía

- Alvarado-Rosales, D., Silva-Rojas, H. V., Ávila-Quezada, G. D., & Trejo-Espino, J. (2008). *Lasiodiplodia theobomae*, agente causal de la muerte regresiva del aguacate en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 119-125.
- Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R., & Hernández-López, M. (2014). A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit, during the postharvest, supply chain. *Crop Protection*, 49, 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.12.012>
- Everett, K. R., Minchin, P. E. H., & Pak, H. A. (2010). Postharvest, diseases of avocado fruit in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 63, 91-97. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2010.63.6260>
- Garrido, C., Carbú, M., Fernández-Acero, F. J., Boonham, N., Colyer, A., & Budge, G. (2019). Emerging pathogens in avocado fruits: A review. *Plant Pathology*, 68(1), 18-29. <https://doi.org/10.1111/ppa.12972>
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the fungi* (10th ed.). CABI.
- Lopez-Lopez, M. E., Del-Toro-Sanchez, C. L., Ochoa-Ascencio, S., Aguilar-Lopez, J. A., Martinez-Cruz, O., Madrigal-Pulido, J. A., Robles-Garcia, M. A., Bernal-Mercado, A. T., Avila-Novoa, M. G., Guerrero-Medina, P. J., & Gutierrez-Lomeli, M. (2023). Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas en Tanaxuri, Michoacan, Mexico contra patogenos poscosecha del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill). *Biotecnia*, 25(1), 24-33. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1726>
- Mehl, J. W. M., Slippers, B., Roux, J., Wingfield, M. J., & Wingfield, B. D. (2017). Overlan of latent pathogens and stem canker fungi on Eucalyptus, *Australasian Plant Pathology*, 46(1), 41-50. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0459-8>

- Silva-Rojas, H. V., & Ávila-Quezada, G. D. (2011). Phylogenetic, and morphological identification of *Colletotrichum boninense*; A novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60(5), 899-908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02445.x>
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae, as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact, *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Tovar-Pedraza, J. M., Mora-Aguilera, G., Nava-Díaz, C., & Valdovinos-Ponce, G. (2012). Etiología de la muerte descendente de aguacate en Michoacán, México. *Agrociencia*, 46(3), 311-325.
- University of Washington. (2020). *Field guide to common tree diseases*, UW Press.
- Úrbez-Torres, J. R. (2011). The status of Botryosphaeriaceae, species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(4), S5-S45.
- Zhang, W., Hyde, K. D., Cai, L., & Chen, H. (2023). Phylogeny, and taxonomy of Botryosphurriaceae: Insights from combined multilocus analyses. *Persoonia*, 51, 1-29. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2023.51.01>

Anexos

Hongos microscópicos un enemigo silencioso bajo tus pies

Publicado en la revista Saber Mas ISSN: 2007-7041, de la Universidad Michoacana de San
Nicolas de Hidalgo, Número 78 (Año 13: 72-75).

Hongos microscópicos, un enemigo silencioso en los cultivos

Escrito por Juan Mendoza-Churape y Ma. Blanca Nieves Lara-Chávez



HONGOS MICROSCÓPICOS, UN ENEMIGO SILENCIOSO EN LOS CULTIVOS

Juan Mendoza-Churape y Ma. Blanca
Nieves Lara-Chávez

Año 13 / Número 78 / 2024

RECIBIDO: 14/11/2023; **ACEPTADO:**
26/02/2024; **PUBLICADO:** 31/01/2025

RESUMEN

Hablar de hongos es mucho más complejo de lo que creemos, ya que existen diversos grupos con diferentes hábitos de crecimiento y tamaño, algunos son beneficiosos, pero también podemos encontrar patógenos de otros organismos, a la vez que pueden ser microscópicos y macroscópicos. En nuestro país hay una gran diversidad de hongos que son utilizados como alimento, aprovechados por sus propiedades medicinales y para realizar rituales. Asimismo, están los hongos denominados fitopatógenos, los cuales causan enfermedades en las plantas y, en ocasiones, las llevan a la muerte. En este artículo te presentamos a este grupo de hongos

microscópicos, los daños que provocan en las plantas y cómo llevar a cabo su control en los cultivos.

Palabras clave: enfermedades, hongos fitopatógenos, plantas.

Juan Mendoza-Churape

Estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas,
Laboratorio de Fitopatología, Facultad de Agrobiología «Presidente Juárez»,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Morelia, Michoacán.
juan.churape@umich.mx

Ma. Blanca Nieves Lara-Chávez

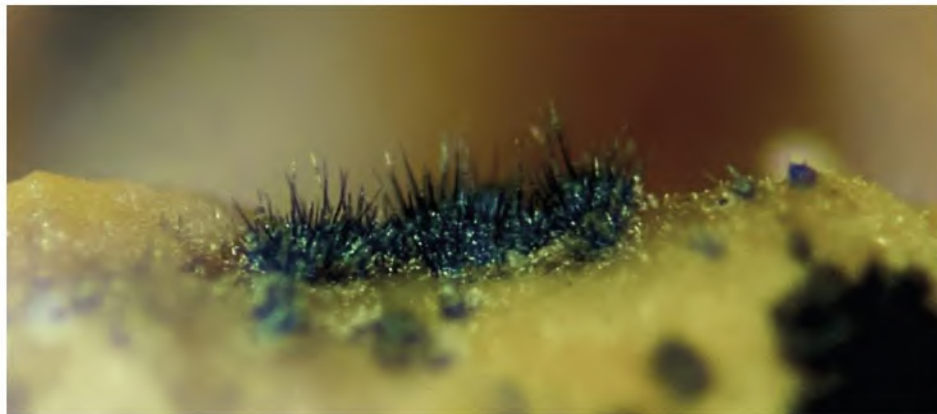
Profesor e Investigador del Laboratorio de Fitopatología,
Facultad de Agrobiología «Presidente Juárez»,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Morelia, Michoacán.
blanca.lara@umich.mx

Seguramente, si hablamos de hongos, la primera imagen que se viene a la mente es el típico hongo de sombrero color rojo con manchas blancas o los que consumimos habitualmente conocidos como champiñones. Sin embargo, **hablar de hongos es mucho más complejo**, ya que estos organismos conforman el reino Fungi y, dentro de ellos, **existen un sinnúmero de miembros con hábitos de vida**

muy diversos, desde saprófitos, fitopatógenos y benéficos, hasta otros que forman estructuras microscópicas que, en ocasiones, no son detectables por el ojo humano.

México cuenta con una abundante diversidad de hongos; no obstante, aún quedan muchas especies por describir. Desde tiempos antiguos **han formado parte no solo de la cultura prehispánica como alimento y componente de rituales, sino que también han cumplido una importante tarea desde el punto de vista ecológico**, entre los que encontramos descomponedores de materia orgánica y contrastantemente como benéficos al formar asociaciones simbióticas con las plantas.

Otros destacan por sus **propiedades medicinales o sus efectos nocivos** al producir sustancias tóxicas para otros organismos, como aves, mamíferos y al mismo ser humano. En el caso de las plantas, al desarrollar sus ciclos biológicos, los hongos producen diversos síntomas en ellas; a estos se les denomina fitopatógenos que, en ocasiones, causan la muerte de las plantas. Por tal razón, **es necesario informar de estos grupos de hongos microscópicos, cómo se identifican y cuál es el impacto que tienen como fitopatógenos en especies vegetales.**



¿Qué es un hongo fitopatógeno microscópico?

Para darnos una idea de la importancia de estos hongos, se tienen registros de que **más de la mitad de los géneros identificados pertenecientes al reino Fungi son microscópicos**, pero, paradójicamente, la mayoría de los estudios en este

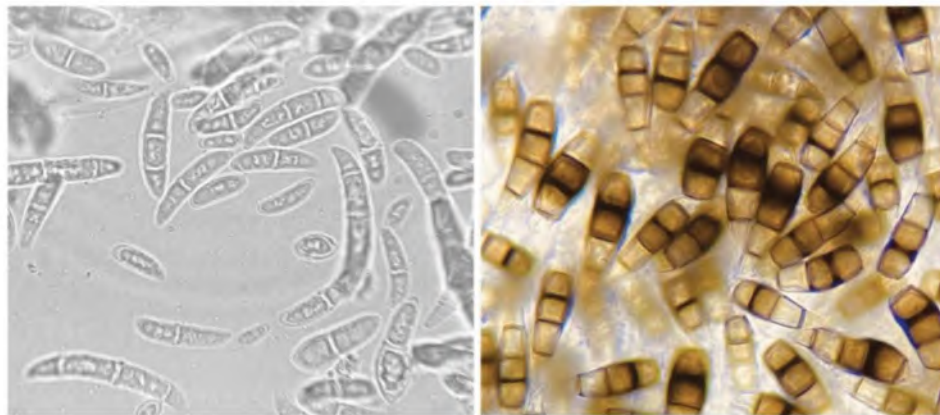
reino se ha centrado en hongos macromicetos, es decir, los que sí podemos ver a simple vista. Los microscópicos, generalmente, **causan enfermedades en las plantas**, tanto cultivadas como silvestres y su **ciclo de vida lo completan dentro del hospedero** (en la planta que atacan). Sin embargo, esto no sucede siempre, ya que en ocasiones necesita un hospedero alternativo, por lo que son tan devastadores.



¿Qué determina esta clasificación?

Se **clasifican por el tamaño de sus cuerpos fructíferos** o también conocidos como esporóforos o conidióforos, **estructuras reproductivas que generan conidios o esporas**, las cuales son las **células reproductoras de los hongos**. Estas estructuras que producen los hongos microscópicos se miden en micrómetros y **para su observación se requiere de un microscopio compuesto**, por lo que son llamados micromicetos que no podemos verlos a simple vista. Estos cuerpos fructíferos **presentan una morfología variada**, pero a la vez muy compleja, lo que requiere de técnicas más específicas para su identificación y caracterización.

Por lo anterior, el desarrollo de los antecedentes de los micromicetos está relacionado con las **investigaciones y desarrollo de técnicas** como la identificación molecular basada en la secuenciación de fragmentos de ADN, herramienta que **ha ayudado a su identificación para conocer la biodiversidad dentro de las enfermedades de las plantas** y comprender la biología de estos organismos capaces de acabar con plantaciones enteras de interés agrícola. Con esto, se han **desarrollado técnicas de manejo y control de estos fitopatógenos**, lo que ha permitido comprender el maravilloso mundo fúngico microscópico.



Algunos hongos microscópicos con importancia fitopatógena en cultivos

agrícolas

Existen **cientos de micromicetos causantes de enfermedades en cultivos agrícolas**, pero destacan ciertos géneros por su gran rango de hospederos, severidad, virulencia y por ser cosmopolitas. Por ejemplo, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Giberella*, *Botrytis*, *Pestalotia* y *Alternaria*, hongos fitopatógenos que tienen un gran impacto negativo, ya que se reporta que son los **responsables de mermar hasta un tercio de la producción mundial de los alimentos**. Se sabe que infectan plantas de varios alimentos de la canasta básica a nivel mundial, como arroz, frijol, trigo, maíz, papa y soya. También están estrechamente relacionados con enfermedades en plantas leñosas, frutales y maderas preciosas, así como de árboles de interés ecológico, a los cuales les causan la muerte.

El control de estos hongos **eleva los costos de producción en el campo**, ya que se utilizan fungicidas, mayormente derivados de síntesis química, que además de ser nocivos para la salud humana, son contaminantes del ambiente por su residualidad y son responsables de generar resistencia a estos compuestos en algunos de ellos.

Síntomas y signos que producen los hongos micromicetos en las plantas

Los micromicetos fitopatógenos **expresan síntomas localizados o multisitio de manera simultánea o sistemática en la planta**. Entre los síntomas más destacables se encuentra la pérdida de vigor de la planta, el amarillamiento de las hojas, las pudriciones de frutos y del sistema radicular, canchales en tallos, muerte descendente de ramas, defoliaciones, tizones en panículas, brotes y marchitez, síntoma ocasionado por daño a los vasos conductores del xilema y floema. Asociados a estos síntomas, el tejido infectado expresa signos (evidencia física del fitopatógeno) que, generalmente, son microscópicos. **Los síntomas aparecen según la fase del ciclo de vida en la que se encuentre el hongo**.

Si el hongo se encuentra en su fase asexual, es posible que desarrolle esporangióforos, esporangios, conidióforos, picnidios, acérvulos, esporodóquios o conidios. Si se encuentra en su fase sexual, produce estructuras como peritecios, cleistotecios, apotecios, uredosporas y teliosporas. En ambas fases se

puede encontrar micelio con hifas cenocíticas (sin septos) o septadas. Algunos hongos producen clamidosporas y esclerocios que son estructuras esféricas de resistencia para sobrevivir a condiciones ambientales adversas, como **el género *Fusarium*, que puede permanecer por mucho tiempo inactivo hasta que se den las condiciones ideales para germinar y continuar su ciclo de vida.**

Estas estructuras son de vital importancia para la identificación, ya que aportan caracteres taxonómicos que nos ayudan a dilucidar entre géneros, inclusive entre especies. **El tipo de signo también es útil para darnos una idea de qué condiciones favorecen la diseminación del fitopatógeno**, por ejemplo, todas aquellas estructuras que se encuentren de manera libre en el tejido, como los conidióforos, esporangióforos, uredosporas y teliosporas, son fácilmente dispersadas por el viento. Las que se encuentran inmersas en el tejido vegetal o cuerpo fructífero necesitan de la escorrentía y salpicadura de lluvia para ser dispersadas, como es el caso de los acérvulos, picnidios y peritecios. **Esta información es útil desde el punto de vista de manejo de la enfermedad para tomar las medidas pertinentes.**



Gómez D.S., Valdovinos P.G., Rojas M.R.I. y Zavaleta M.E. (2012). Cambios morfológicos en células de chile cm334 inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(1), 66-71.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092012000100006

Ulloa M. y Hanlin R.T. (2012). *Illustrated dictionary of mycology*. Second Edition, St. Paul, Minnesota: APS Press, 784 pp.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532015000100279

Zúñiga-Castro K. y Quirós-Cedeño G. (2021). Los hongos como elementos clave en la productividad del suelo, la agricultura y el bienestar social. *Revista Biocenosis*, 32(1), 1-13.
<https://revistas.uned.ac.cr/index.php/biocenosis/article/view/3548/4566>

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa interinstitucional de Doctorado en Ciencias Biologicas	
Título del trabajo	Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo de aguacate (Persea americana, Mill)	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Juan Mendoza Churape	juan.churape@umich.mx
Director	Margarita Vargas Sandoval	margarita.vargas@umich.mx
Codirector	Tania Raymundo Ojeda	raymundo.tr@gmail.com
Coordinador del programa	Rodolfo Perez Rodriguez	doc.cienciasbiolo.biologicas@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	no	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	no	
Traducción a otra lengua	no	
Revisión y corrección de estilo	no	
Análisis de datos	no	
Búsqueda y organización de información	no	
Formateo de las referencias bibliográficas	no	
Generación de contenido multimedia	no	
Otro		

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Juan Mendoza Churape
Lugar y fecha	Morelia, Michoacan. A 22 de Septiembre de 2025.

Juan Mendoza Churape

Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo de aguacate (Persea americana, Mill).pdf

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega InmolId:3117503434373	89 páginas
Fecha de entrega 25 sep 2025, 9:22 a.m. GMT-6	6834 palabras 42.076 caracteres
Fecha de descarga 25 sep 2025, 9:57 a.m. GMT-6	
Nombre del archivo Botryosphaeriaceae asociadas al cultivo de aguacate (Persea americana, Mill).pdf	
Tamaño del archivo 22.5 MB	

3% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para co...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- | | |
|----|---|
| 3% |  Fuentes de Internet |
| 1% |  Publicaciones |
| 0% |  Trabajos entregados (trabajos del estudiante) |

Marcas de Integridad

N.º de alertas de integridad para revisión
No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si observáramos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarse.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.