



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Programa Institucional de
Maestría en Ciencias Biológicas
Área Temática: Interacción Planta-Microorganismo-Insecto



TESIS

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL DE LA ROÑA DEL
AGUACATE (*Persea americana* Mill.), EN MICHOACÁN Y JALISCO**

Como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ING. CLAUDIA ISABEL LÓPEZ CORNEJO

DIRECTOR:

Dr. JOSÉ LUCIANO MORALES GARCÍA

CO-DIRECTORA:

Dra. SOLEDAD GARCÍA MORALES

URUAPAN, MICHOACÁN, AGOSTO DE 2021.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVO GENERAL	3
3.1. Objetivos específicos	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Producción y comercialización del aguacate	4
4.2. Plagas del aguacate	5
4.3. Enfermedades del aguacate	6
4.4. Roña del aguacate	7
4.5. Identificación filogenética de hongos fitopatógenos	14
4.5.1. Espacios internos entre transcritos (ITS)	15
4.5.2. Gen 28S (Subunidad grande o LSU)	16
4.5.3. Factor de elongación 1-alpha	16
5. METODOLOGÍA	17
5.1. Colecta de material vegetal	17
5.2. Aislamiento	19
5.3. Identificación morfológica	20
5.4. Identificación molecular	21
5.5. Pruebas de patogenicidad	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1. Aislamientos	25
6.1.1. Síntoma de “roña típica”	27
6.1.2. Síntoma de “mancha púrpura”	28
6.2. Identificación molecular	34
6.2.1. Análisis filogenético de las cepas aisladas de “roña típica”	36

6.2.2. Análisis filogenético de las cepas aisladas del síntoma de “mancha púrpura”	39
6.3. Pruebas de patogenicidad	46
6.3.1 <i>Pestalotiopsis</i> sp.	46
6.3.2. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	48
6.3.3. Cepa de referencia ATCC 11190 (teleomorfo <i>E. perseae</i> = anamorfo <i>S. perseae</i>)	49
6.3.4. <i>Elsinoe perseae</i>	51
7. CONCLUSIONES	53
8. LITERATURA CITADA:	54

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Geoposicionamiento de los sitios muestreados para la colecta del material vegetal.	17
2. Primers utilizados para la amplificación e identificación molecular de los aislados fúngicos.	23
3. Cepas identificadas morfológicamente, aisladas del síntoma de “roña típica”.	26
4. Cepas identificadas morfológicamente, aisladas del síntoma de “mancha púrpura”.	26
5. Resultado de la identificación molecular de las cepas aisladas del síntoma de “roña típica” mediante la amplificación de los primers ITS5/ITS4.	35
6. Resultado de la identificación molecular del hongo aislado del síntoma de “mancha púrpura” mediante la secuencia de los genes LSU, EF-1 α e ITS.	35
7. Secuencias seleccionadas del GenBank para el análisis filogenético de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	36
8. Secuencias seleccionadas para el análisis filogenético de <i>Elsinoe perseae</i> .	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Patrón de lesiones severas en el pericarpio provocadas por trips similares a los provocados por la roña. Fuente: Rosen, 1990.	6
2. Síntomas de la roña del aguacate, a) síntomas esquematizados por Jenkins en 1934, b) síntomas descritos por Everett <i>et al.</i> (2011).	8
3. Primer reporte de la roña del aguacate a nivel mundial, a) muestras enviadas por J.W. Krome en 1916, b) muestras de primeros síntomas en vivero de Florida (Stevens, 1918).	9
4. Síntoma de la “mancha púrpura”, de acuerdo con lo descrito por Morales-García (2017), a) lesiones pequeñas de 3 a 4.5 mm oscuras y elevadas en “frutos canica” 3ª etapa fenológica, b y c) lesiones de 2 y 1.4 cm, respectivamente, que superan a lo reportado por Everett <i>et al.</i> (2011), d) síntoma avanzado de mancha púrpura. Fotografías: Hinojosa-Paredes Ángel G.	12
5. Síntomas de roña reportados en campo, a) roña del aguacate reportado por Morales-García (2020), b) roña del aguacate reportada por Becerra-Morales (2019), c) roña del aguacate reportado Leyva-Mir (2020), d) roña del aguacate, HV- FAUBA, (2021).	13
6. Síntomas de roña reportados en Nueva Zelanda provocado por <i>Phaeoseptoria</i> sp. a) espécimen del herbario PDD 58048 con síntomas de roña del aguacate descrito por Hartill (1991) erróneamente identificado como <i>E. perseae</i> , b) espécimen del herbario PDD 57 autenticado por A.E. Jenkins como síntoma de la roña del aguacate en Florida, c) aguacate con menos de 1 mes de formación procedente de una plantación en Nueva Zelanda mostrando costra. Fuente: Everett <i>et al.</i> (2007).	14

7. Tipos de roña provocado por diferentes agentes causales, a) daño severo por alta incidencia de ácaros, b) síntoma por daño mecánico, c) síntomas por mordedura de larvas. Fotografías: Hinojosa-Paredes A., d) daño severo por trips. **18**
8. Síntomas de roña en los frutos colectados, a) síntoma avanzado de “mancha púrpura” en campo, b) vista del síntoma de “mancha púrpura” al microscopio estereoscópico, c) síntoma avanzado de “roña típica” en campo, d) vista al microscopio estereoscópico del síntoma inicial de “roña típica”, e) vista al microscopio estereoscópico de ambos síntomas presentes en un fruto. **19**
9. Monitoreo del crecimiento micelial del tejido vegetal sembrado, a) crecimiento de la colonia aislada del tejido vegetal con síntoma de roña, b) desarrollo de hifas sobre síntoma de mancha púrpura visto al microscopio estereoscópico. **20**
10. Desarrollo de las actividades para la identificación molecular de los hongos aislados de frutos de aguacate con síntomas de “roña típica” y “mancha púrpura”, a) crecimiento de la colonia en medio líquido, b) macerado de tejido con nitrógeno líquido, c) resultado de la separación de la fase acuosa y la fase orgánica, d) electroforesis para la verificación de la calidad del ADN genómico, e) cuantificación del ADN genómico en el espectrofotómetro, f) amplificación de los fragmentos de ADN por PCR en el termociclador. **23**
11. Colonias con mayor porcentaje de aparición, obtenidas de frutos con síntoma de “roña típica”, a) colonia fúngica identificada morfológicamente como *Colletotrichum* sp., b) estructuras de reproducción (conidios) característicos del género *Colletotrichum*, c) colonia fúngica identificada morfológicamente como *Pestalotiopsis* sp. con masas de conidios negras, d) conidios fusiformes característicos del género *Pestalotiopsis*. **28**
12. Cepa de referencia ATCC 11190 de *Elsinoe perseae*, a) colonias cerebroides de 2 meses de crecimiento, b) micelio septado toruloso, c) conidio pequeño (3 μ m), similar a los del género *Colletotrichum*. **29**

13. Variación en el tipo de crecimiento de los aislamientos de *E. perseae*, a) crecimiento de tipo cerebroide, en colonias de dos semanas de crecimiento, b) crecimiento viscoso o pulvinado, en colonias de dos semanas de crecimiento. 29

14. Cepas identificadas morfológicamente como *Elsinoe* sp., a) - l) plasticidad morfológica de las cepas de *Elsinoe* sp. después de su reaislamiento. 30

15. Identificación morfológica de *Elsinoe* sp., a) germinación del micelio estromático del tejido vegetal, b) micelio septado de crecimiento toruloso, c) conidios pequeños similar a los del género *Colletotrichum*, observado en los primeros días de crecimiento, antes de formarse el estroma, d), e) y f) presencia de monofiálides con conidio en el extremo. 31

16. Cortes histológicos en fruto de aguacate con síntoma de “mancha púrpura”, a), b) y c) presencia de conidióforos libres y conidios pequeños similares a los del género *Colletotrichum*, d) y e) presencia de acérvulos con micelio germinando, visto a 40 X (a, b y d) y a 100X (c y e), f), g) y h) corte de tejido vegetal de hoja de aguacate atacada por *E. perseae* con presencia de conidióforos y conidios visto a 100 X (Jenkins, 1934). 32

17. Liberación de elsinocromos en el medio de cultivo, a) cepa identificada morfológicamente como *E. perseae* de 2 semanas de crecimiento, b) vista inferior de cajas Petri, con colonias de 3 meses de crecimiento, c) y d) vista superior de las cepas, donde se observa el halo rojo de los pigmentos liberados, e), f) y g) montajes de cepas identificadas como *E. perseae*, liberando elsinocromos en el medio (lactofenol). 33

18. Amplificación por PCR de las cepas aisladas de los síntomas de “roña típica” y “mancha púrpura”, a) amplificación con ITS5/ITS4, para las cepas C1, C4 y C7, b) amplificación con los Primer ITS1/IT4 para la cepa H6, H3 y H4, c) amplificación con Sph1F/Sph1R, para las cepas identificadas como *Elsinoe* 34

perseae (C1, C4, H3, H4, H6), d) amplificación con EF-1 α F/ EF-1 α R, para las cepas identificadas como *E. perseae* (C1, C4, H3, H4, H6).

19. Árbol filogenético Bayesiano para el complejo *Colletotrichum gloeosporioides*, reconstruido utilizando los primers ITS5/ITS4. En rojo se muestra la cepa aislada en este trabajo. La barra indica la sustitución por sitio. En los nodos se ejemplifica la probabilidad posterior (PP). Se utilizó como grupo externo *C. boninense* cepa 126, perteneciente a otro complejo del género. . 38

20. Árbol filogenético Bayesiano para las especies del género *Elsinoe*, reconstruido utilizando secuencias concatenadas de los primers ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, EF-1 α F/EF-1 α R, Sph1 F/Sph1 R. En rojo se encuentran las cepas aisladas en este trabajo. La barra indica la sustitución por sitio. En los nodos se ejemplifica la probabilidad posterior (PP). Se utilizó como grupo externo la especie *Myriangium hispanicum* cepa CBS 227.59, perteneciente a otra familia del mismo orden. 45

21. Evaluación de la patogenicidad de *Pestalotiopsis* sp. sobre frutos y tallos de plantas de aguacate criollo y de las variedades Hass y Flor de María, a), b) y c) necrosis total de los tallos inoculados, Variedades Hass y Flor de María d) tallos con severidad moderada, e) síntomas de necrosis con grietas costrosas en plantas criollas, f) momificación del fruto por necrosis total en la variedad Flor de María 47

22. Prueba de patogenicidad de *C. gloeosporioides*. a) síntoma inicial en frutos de aguacate variedad Hass, b) expresión del síntoma a los tres meses de la inoculación, c) síntoma de agrietamiento, d) necrosis de ramas, e) y f) ramas jóvenes y pedúnculo con machas necróticas que al unirse forman una costra, similar a lo reportado para *E. perseae*. 49

23. Evaluación de la patogenicidad de la cepa ATCC11190 de (*Elsinoe perseae* = *Sphaceloma perseae*) a) síntoma inicial en tallos de plantas de aguacate criollo, b) síntoma avanzado en tallos de plantas criollas, c) desarrollo del hongo en pecíolo y nervadura de las hojas, d) desarrollo del síntoma en fruto criollo, e) 50

lesiones pequeñas con agrietamiento en frutos de plantas criollas, f) síntoma inicial en frutos de la variedad Hass.

24. Resultados de la prueba de patogenicidad de la cepa ATCC 11190 (*E. perseae* = *S. perseae*) en hojas de plantas de aguacate criollo, a) y b) deformación de hojas por ataque a la nervadura central, c) vista al microscopio estereoscópico del daño en nervadura central y parte del pecíolo, d) y e) lesiones en la lámina foliar, f) perforación de la lámina foliar por daño avanzado de roña, g) y h) síntoma de roña en hojas de aguacate según Jenkins (1934). **51**
25. Síntomas iniciales en las pruebas de patogenicidad con la evaluación de *E. perseae*, a) síntomas iniciales en el fruto 1 de la variedad Flor de María, b) síntomas en el fruto 1, dos meses después de la aparición del síntoma inicial, c) Síntomas iniciales en fruto 2, d) síntomas en el fruto 2 de la variedad Flor de María dos meses después de la aparición del síntoma inicial. **52**

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el CONACYT con recursos del proyecto apoyado por el FOINS PN/2016-2928 “Agentes antifúngicos provenientes de plantas para el control de *Sphaceloma perseae* Jenkins en aguacate”.

RESUMEN

A nivel mundial, México es el país más destacado en la producción de aguacate (*Persea americana* Mill) y los estados de Michoacán y Jalisco son los principales exportadores de este fruto. La roña del aguacate es considerada como una de las enfermedades fúngicas de mayor importancia económica para este cultivo y se caracteriza por provocar lesiones de apariencia corchosa en el pericarpio de los frutos, sin afectar a la pulpa. Esta enfermedad se reportó en 1934 y se asoció a *Elsinoe perseae* (anamorfo, *Sphaceloma perseae*) como el agente causal; sin embargo, después de su reporte, no se han reproducido las pruebas de patogenicidad para corroborar que este patógeno sea el responsable del síntoma de la roña del aguacate. En este trabajo se aisló e identificó a los patógenos asociados al síntoma de esta enfermedad en frutos de aguacate en los estados de Michoacán y Jalisco. Se realizó un muestreo dirigido de frutos y se identificaron dos síntomas con daño en el pericarpio de aspecto corchoso, nombrados en campo como “roña” y “mancha púrpura”. Para la identificación molecular y filogenética se utilizó una combinación de técnicas de identificación con claves morfológicas y marcadores moleculares (ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, FE-1 α /EF-1 α , Sph1 F/Sph1R). Las pruebas de patogenicidad *in vitro* se realizaron en plantas criollas y en las variedades Hass y Flor de María para determinar el agente causal del síntoma. Se obtuvieron 17 cepas de hongos aislados de frutos de aguacate con síntomas de roña. Mediante el análisis morfológico se identificaron a los hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Elsinoe*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* y *Epicoccum*. Con la identificación molecular y el análisis filogenético se corroboró la presencia de las especies *Colletotrichum gloeosporioides* y *Elsinoe perseae*. En las pruebas de patogenicidad, no fue posible reproducir el síntoma idéntico a la roña del aguacate; aunque, *C. gloeosporioides* reprodujo síntomas similares. Con la cepa identificada como *E. perseae* se corroboró el síntoma conocido en campo como “mancha púrpura”. Mientras que, *Pestalotiopsis* sp. provocó una necrosis descendente.

Palabras clave: agente causal, síntoma, roña, hongos asociados, *Elsinoe perseae*

ABSTRACT

México is the most important avocado (*Persea americana* Mill) producer in the world, and the states of Michoacán and Jalisco are the main exporters of this fruit. Avocado scab is considered one of the most economically important fungal diseases for this crop. It is characterized by corky lesions on the pericarp of the fruit, without affecting the pulp. This disease was reported in 1934 and was associated with *Elsinoe perseae* (anamorph, *Sphaceloma perseae*) as the causal agent; however, since its report, pathogenicity tests have not been reproduced to corroborate that *E. perseae* is the pathogen responsible for the avocado scab symptom. In this research was to isolate and identify the pathogens associated with this disease on avocado fruit, in the states of Michoacán and Jalisco. A targeted sampling was conducted and two symptoms with corky pericarp damage, named in the field as "scab" and "purple spot", were identified. A combination of identification techniques with morphological codes and molecular markers (ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, EF-1 α /EF-1 α , Sph1F/Sph1R) was used for molecular and phylogenetic identification. *In vivo* pathogenicity tests were carried out on criollo plants and on Hass and Flor de María varieties to determine the causal agent of scab symptoms. Seventeen fungal isolates were obtained from avocado fruits with scab symptoms. Fungi of the genera *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Elsinoe*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium*, and *Epicoccum* were identified by morphological analysis. Molecular identification and phylogenetic analysis corroborated the presence of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Elsinoe perseae* species. In pathogenicity tests, it was not possible to reproduce the symptom identical to avocado scab; however, *C. gloeosporioides* reproduced similar symptoms. With the inoculation of the isolate identified as *E. perseae*, the symptom known in the field as "purple spot" was corroborated. Meanwhile, *Pestalotiopsis* sp. caused descending necrotic lesions.

Keywords: causal agent, symptom, scab disease, associated fungi, *Elsinoe perseae*

1. INTRODUCCIÓN

Existen más de 8,000 especies de hongos que pueden causar enfermedades en las plantas (Muñiz-Villareal, 2014). Las enfermedades del aguacate (*Persea americana* Mill.) afectan 40% de la cosecha, por lo cual se consideran un factor que incrementa los costos de producción, ya que se requieren de seis aplicaciones de plaguicidas por temporada para su control acompañado de otras prácticas de manejo y labores culturales. De las enfermedades que atacan a este cultivo, 19 son de origen fungoso, dos de tipo bacteriano y una por algas; del total, se consideran de importancia económica la antracnosis, la roña, el anillamiento del pedúnculo, la tristeza del aguacatero y las enfermedades poscosecha, porque afectan la cantidad y calidad de la cosecha (CEDRSSA, 2017). La roña (*Elsinoe perseae*), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y la pudrición radical *Phytophthora cinnamomi* limitan la productividad, la longevidad del árbol de aguacate y reducen significativamente la calidad del fruto destinado a exportación (Alfaro-Espino *et al.*, 2017).

La roña del aguacate causada por *E. perseae* (Rossman *et al.*, 2016), sinónimo de *Sphaceloma perseae* (Jenkins, 1934), se presenta en las hojas, en las ramas jóvenes y daña el fruto desde la polinización de la flor hasta que está completamente formado. Las lesiones iniciales se presentan como manchas oscuras redondas o irregulares, que al unirse pueden cubrirlos parcial o totalmente y dar un aspecto corchoso color café. En las hojas y las ramas, *E. perseae* puede causar agrietamiento, lo que disminuye el área foliar y como consecuencia la fotosíntesis (Jenkins, 1934).

El síntoma de corchosis en la roña del aguacate es un mecanismo de defensa de la planta que consiste en la estimulación de la división celular y la suberización para crear una capa impermeable o una capa de corcho que aisle la infección y así evitar que avance a las células sanas (Cruz-Borrueal *et al.*, 2006). Este mecanismo se puede activar ante la presencia de más de un agente causal, tanto biótico como abiótico, por lo que resulta complicado realizar un diagnóstico adecuado.

La roña del aguacate se reporta en Florida, donde es la segunda enfermedad en importancia, así como en Puerto Rico, Brasil, África, Perú, Cuba, Haití y California. En Michoacán, la roña del aguacate se encuentra distribuida en toda la región y su presencia es endémica.

Además de la viruela del aguacate, es la enfermedad a la que se dirige el mayor número de aplicaciones de fungicidas para su prevención (Marroquín-Pimentel, 1999).

En Michoacán y Jalisco el cultivar “Fuerte” es el más susceptible a la enfermedad de roña del aguacate, mientras que la variedad “Hass”, sin un manejo preventivo, puede ser afectada severamente y los cultivares criollos locales también presentan daños; aunque, en menor incidencia por la maduración del fruto en primavera (Marroquín-Pimentel, 1999).

El diagnóstico de la roña del aguacate en campo está basado únicamente en los síntomas, esto puede dar lugar a confusiones debido a que otros factores bióticos como la raspadura de los trips o abióticos como el rozamiento de frutos, pueden producir daños de corchosis similares a los de la roña (Correa-Suarez, 2019). Con base en los síntomas más comunes de roña muestreados en el estado de Michoacán, Martínez- Hernández *et al.* (2017) y Becerra-Morales (2019), reportaron que el síndrome de la roña en aguacate es causado por la asociación de varios hongos fitopatógenos, los cuales fueron identificados morfológicamente a nivel de género como *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp. y *Curvularia* sp. y no asociaron a *E. perseae* con el síntoma de roña, en las zonas de colecta.

Después de que Jenkins asociara el síntoma de roña con *E. perseae* en 1934, otros investigadores como Stevens (1922), Hartill (1991), Salgado (1993) y Djeugap *et al.* (2015) han realizado trabajos de identificación y caracterización de los posibles agentes causales de la roña del aguacate. Sin embargo, ninguno de estos autores asociaron el síntoma con *E. perseae* (Becerra- Morales, 2019). Esto sugiere que el síntoma presente en los frutos muestreados puede ser ocasionado por factores abióticos, como se mencionó anteriormente, o por otros microorganismos diferentes a *E. perseae*. Por lo que, el objetivo principal de esta investigación fue la identificación morfológica y molecular de los hongos asociados a síntomas de roña en frutos de aguacate presentes en campo.

2. HIPÓTESIS

El síntoma característico de la roña del aguacate es provocado por más de un agente causal.

3. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar morfológica y molecularmente al agente causal del síntoma de roña en frutos de aguacate.

3.1. Objetivos específicos

- Obtener cepas de los hongos presentes en el síntoma de roña en frutos de aguacate.
- Identificar morfológica y molecularmente los hongos aislados del síntoma de roña de los frutos.
- Comprobar mediante los postulados de Koch la patogenicidad de los hongos aislados.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Producción y comercialización del aguacate

Estados Unidos de América (EUA) prohibió la entrada del aguacate mexicano en 1914, con la justificación de la presencia de plagas cuarentenadas como el gusano barrenador de hueso y de ramas. En 1997, el Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal (APHIS), una división del Departamento de Agricultura de los EUA (USDA), declaró algunos municipios de Michoacán como zonas libres de plagas cuarentenadas y comenzó el desarrollo y auge del aguacate mexicano (Huacuja, 2008). “En 2015 se publica en el Federal Register (7 CFR part 319) las reglas para permitir la importación de aguacate Hass fresco a EUA de todo México, no solo de Michoacán, siendo Jalisco el primer estado elegible para incorporarse al programa de exportación de aguacate Hass debido a que este estado se encuentra preparado para cumplir con los requerimientos establecidos en la regulación vigente” (Rodríguez-Campos *et al.*, 2017).

Actualmente, México es el país más destacado en la producción de aguacate a nivel mundial, ya que solo en la temporada 2018-2019 se exportaron 1,103,043 t, de las cuales 914,530 t se enviaron a EUA (SIAP, 2019). Estados Unidos de América es el principal importador del aguacate producido en el estado de Michoacán, mientras que Jalisco exporta principalmente a Canadá y Japón. Estas actividades están reguladas por la Norma Mexicana NMX-FF-016SCFI-2006 donde se establecen los requisitos de calidad del fruto, etiquetado y envasado. Además, la NOM-066-FITO-2002 establece las especificaciones para el manejo fitosanitario y movilización del fruto de aguacate (APEAM, 2020a; APEAJAL, 2020).

Económicamente, el aguacate es la especie frutal más importante en México, el estado de Michoacán es el mayor productor con una aportación de 74.9%, seguido de Jalisco con 10% del total nacional. Datos a diciembre del 2019 indican que Michoacán aportó 1,725,225.79 t y Jalisco 631,612.68 t de las 2,300,888.90 t producidas en el país (SIAP, 2020).

Los municipios más importantes para Michoacán son: Peribán, Uruapan, Tancítaro, San Juan Nuevo, Tacámbaro, Ario de Rosales, Tingüindín, Zitácuaro, Atapan, Salvador Escalante y Ziracuaretiro. En Jalisco destacan los municipios de Zapotlán El Grande, San Gabriel, Gómez

Farías y Concepción de Buenos Aires (SIAP 2020); “Hass” es la principal variedad cultivada (Beltrán, 2008).

La importancia socioeconómica del aguacate se deriva del beneficio que representa entre productores, comercializadores, industrializadores y consumidores. En México se reporta un rendimiento promedio de 10.66 t ha⁻¹ y un área cosechada de 215,942.12 ha, seguido de República Dominicana, Perú, Indonesia, Colombia, Brasil, Kenia, Estados Unidos de América, Venezuela, Israel, China y Sudáfrica, entre otros (FAOSTAT, 2018).

El principal importador de aguacate mexicano es EUA, precedido de Japón, Canadá, China y la Unión Europea, en estos países la aceptación del producto mexicano va en aumento (Torres-Preciado, 2009). Datos de la Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México (APEAM) reportan que EUA importó aproximadamente 1,042,000 t del fruto en la temporada 2018-2019, y solo en enero del 2020 se exportaron 127,000 t para el evento del “Super Bowl”, el principal mercado para los productores de aguacate (APEAM, 2020b).

4.2. Plagas del aguacate

Existe una gran cantidad de especies de diferentes órdenes de insectos que pueden afectar la producción y comercialización nacional e internacional del aguacate, las más destacadas son trips (*Frakliniella* y *Scirtothrips*), ácaros (*Tetranychus*), barrenadores del hueso y ramas (*Conotrachelus*, *Heilipus Stenoma* y *Copturus*) y agallador de hoja (*Trioza anceps*) (SENASICA, 2018).

De las plagas presentes en el cultivo del aguacate, los trips son un problema constante debido a que el estado de Michoacán tiene climas aptos para que los árboles de aguacate produzcan hasta cuatro floraciones por año y en el resto de los estados productores los trips migran a las flores de la flora silvestre usándolos como hospedantes alternos (INTA, 2016).

Maldonado y colaboradores, en 2017, modelaron mapas de distribución espacial de los trips en relación con el cultivo de aguacate, con el fin de identificar el comportamiento de esta plaga y tomar acciones para su control, ya que, es considerado como un facilitador para la entrada de enfermedades entre las que destaca la roña del aguacate (*E. perseae*).

En particular, los trips provocan el daño en el estado de desarrollo llamado “cerillo” o “cabeza de fósforo”, provocando protuberancias o crestas en la superficie del pericarpio, las cuales son evidentes en los frutos maduros (González *et al.*, 2000). Cuando el fruto presenta un daño severo se forman crestas en mayor cantidad y longitud, que dan un aspecto de deformidad al pericarpio y que suelen estar acompañadas de lesiones abundantes de color café, similares a la roña (INTA, 2016) (Figura 1).



Figura 1. Patrón de lesiones severas en el pericarpio provocadas por trips similares a los provocados por la roña. Fuente: Rosen, 1990.

4.3. Enfermedades del aguacate

Todas las áreas productivas para el aguacate están sujetas a grandes pérdidas debido a los factores bióticos y abióticos que prevalecen en las zonas del cultivo (Tamez-Guerra *et al.*, 2001). Las enfermedades de origen biótico afectan directa e indirectamente al fruto y se han convertido en la mayor amenaza del comercio internacional, debido a que el fruto para exportación debe ser de la más alta calidad (García *et al.*, 2013).

En los últimos años, el área sembrada ha aumentado aceleradamente, lo que genera grandes retos tecnológicos para garantizar la sostenibilidad de las plantaciones. El cultivo de aguacate presenta una gran cantidad de problemas fitosanitarios de los cuales resaltan los problemas

de raíz, principalmente *Phytophthora cinnamomi* debido a que puede provocar la muerte del árbol (Ramírez-Gil *et al.*, 2014).

Dentro de las enfermedades que atacan la parte aérea de la planta, se encuentra la antracnosis, ocasionada por el género *Colletotrichum*, este hongo es uno de los principales patógenos del aguacate ‘Hass’, mermando su calidad, el daño que causa al generar pudriciones directamente en el fruto limita la comercialización, disminuye el valor del producto e impide la posible exportación (Ávila-Quezada *et al.*, 2007). La antracnosis se caracteriza por presentar lesiones oscuras y hundidas, circulares o elipsoidales, con grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosadas en frutos, hojas y ramas (Coria, 2008).

En orden de importancia seguido de la antracnosis se encuentra la roña del aguacate. Este síntoma, a pesar de no encontrar reportes que indiquen una afectación en la pulpa del fruto, provoca una disminución en la calidad visual del fruto, afectando directamente la comercialización y las exportaciones.

4.4. Roña del aguacate

La roña del aguacate es el nombre común con el que se le conoce al síntoma de origen fungoso provocado por la estimulación de mecanismos de defensa estructurales inducidos en las plantas ante la presencia de un agente invasor (biótico o abiótico), los cuales involucran cambios histológicos (Antonelli, 1980). En este caso, la planta produce capas de corcho que impiden el avance del micelio fúngico al tejido sano (Ramírez-Gómez y Rodríguez, 2012).

Esta enfermedad causa lesiones en ambos lados de la superficie de las hojas y en la epidermis de los frutos jóvenes. En el fruto, los síntomas son coloraciones que varían de marrón a negro con hasta 3 mm de diámetro generalmente de forma circular (Jenkins, 1925; Jenkins, 1934). En México, los frutos pueden presentar lesiones hasta 10 mm de diámetro, redondeadas con un margen irregular y cuando se unen forman una región costrosa con fisuras marrones (Figura 2) (Everett *et al.*, 2011; Palmateer, 2006).

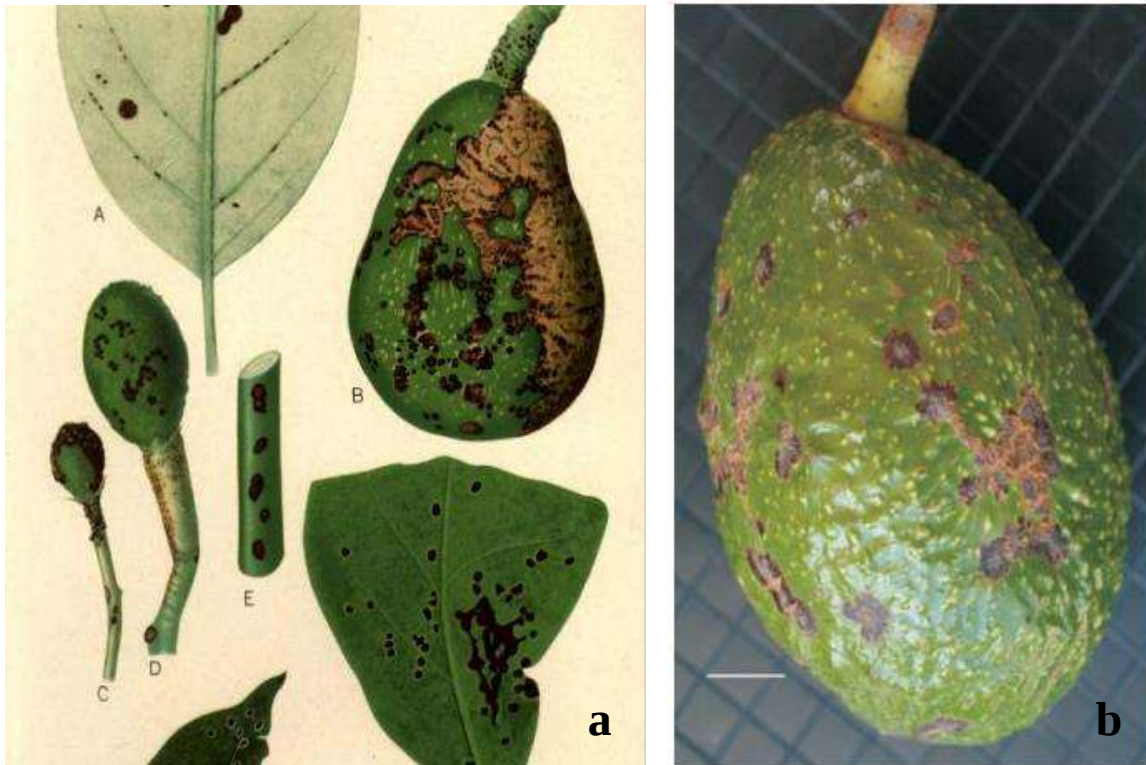


Figura 2. Síntomas de la roña del aguacate, a) síntomas esquematizados por Jenkins en 1934, b) síntomas descritos por Everett *et al.* (2011).

El registro más antiguo publicado sobre la roña del aguacate data del año 1916, cuando el señor W.J. Krome envió muestras del síntoma en frutos de aguacate a la Estación Experimental Agrícola de Florida, EUA. Con esta evidencia se comprobó que la enfermedad estaba presente en Florida (Jenkins, 1939). Posteriormente, en 1918 fue identificada en un vivero de Florida atacando frutos de aguacate de la variedad “Lula”. Inicialmente, se reportó como “Enfermedad dañina de los semilleros” o como “Escaldadura del aguacate” (Figura 3) (Stevens, 1918). En Cuba, se obtuvo un primer reporte por Bruner, en 1920, quien también mencionó la distribución de la enfermedad en Florida (Jenkins, 1939).

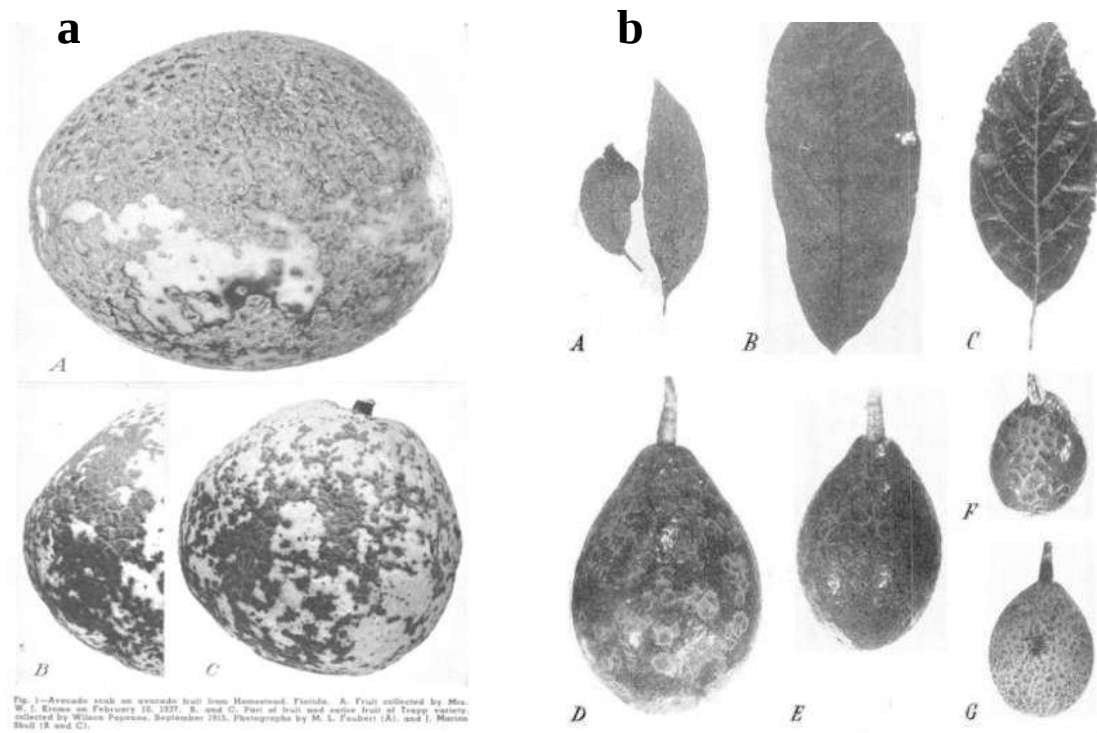


Figura 3. Primer reporte de la roña del aguacate a nivel mundial, a) muestras enviadas por J.W. Krome en 1916, b) muestras de primeros síntomas en vivero de Florida (Stevens, 1918).

Posteriormente, en 1934, Ana E. Jenkins, micóloga de la oficina de la Industria Vegetal en Washington, DC, realizó las pruebas de aislamiento e identificación del agente causal de “la escaldadura” o “roña del aguacate” asociando el síntoma con el hongo *Sphaceloma perseae* (Jenkins, 1939).

Desde que A. Jenkins asoció el síntoma de roña a *Sphaceloma perseae* (= *Elsinoe perseae* Teleomorfo), en 1934, se había referido a éste hongo por su nombre en estado anamorfo. Sin embargo, en el año 2011 se realizaron cambios al Código Internacional de Nomenclatura Botánica (IBC), donde se establece que los hongos que estén identificados molecularmente como iguales, pero en diferente estado reproductivo conservaran únicamente el nombre otorgado a la fase teleomorfica, excepto a los hongos que no se les conozca una fase sexual descrita (McNeill y Turland, 2011). Con base en lo anterior, se establece que la mayoría de las especies descritas originalmente en el género *Sphaceloma* (tipificado asexualmente) ahora pertenecen al género *Elsinoe* (fase sexual) (Rossman *et al.*, 2016). En el caso de *Sphaceloma perseae*, se actualizó como *Elsinoe perseae* debido a que es más común encontrar al género *Elsinoe* como agente causal de la enfermedad de roña en diversas especies frutales, (Li *et al.*, 2011).

De acuerdo con su clasificación *E. perseae* pertenece a los hongos superiores, a la subdivisión Ascomycotina, a clase de los Lóculoascomycetes y al orden de los Myringiales que se caracterizan por tener cavidades en varios niveles y contienen ascas individuales, aquí se encuentran hongos fitopatógenos que generalmente producen antracnosis y costras (Agrios, 2005). El desarrollo colonial puede variar, de tener un crecimiento tipo cerebroide desde el inicio o comenzar con un crecimiento viscoso tipo levaduriforme. Se sabe que esta viscosidad es una de las numerosas variaciones en los cultivos del género *Elsinoe* = *Sphaceloma* (Bitancourt y Jenkins, 1936).

La especie *E. perseae* se caracteriza morfológicamente por tener micelio aéreo liso y fieltro o en mechón asociado con conidióforos. El tamaño de los conidios, van desde 2 a 30 μm x 2.5 μm . Los conidios pueden ser cilíndricos, elípticos, falcados o lunados. Las colonias de *E. perseae* son variables, de blanco grisáceo a gris oscuro, al reverso de color blanco a gris que se oscure especialmente con la edad. En contraste, las colonias del género *Colletotrichum* presentan una coloración salmón debido a la concentración de conidios y en el género *Elsinoe* son de color obscuro (Marroquín-Pimentel, 1999). La fase sexual o teleomorfo de *S. perseae* es el género *Elsinoe* el cual fue introducido por Raciborski (1900) con la descripción de tres especies (*E. antidesmae*, *E. canavaliae* y *E. menispermacearum*). El género *Elsinoe* se caracteriza por formar lesiones similares a costras con pseudoascostromas que contienen de tres a ocho ascas bitunicadas dentro de cada lóculo. Las ascas son periformes a globosas con ocho ascosporas septadas hialinas, oblongas o fusiformes (Fan *et al.*, 2017).

En estudios realizados en la franja aguacatera de Michoacán, se determinó que la severidad de la enfermedad presenta el incremento mayor en los meses de mayo y junio, lo cual coincide con las etapas fenológicas 2 y 3, y paralelamente con el descenso de la humedad relativa (Ávila-Quezada *et al.*, 2002). El periodo más susceptible del fruto es durante el cuajado a un tercio o a un medio de su tamaño normal, ya que, con la maduración del fruto, el pericarpio se endurece. El daño causado a los frutos por insectos, roedores o golpes permite la entrada del hongo; el cual produce esporas sobre el tejido atacado y luego son diseminadas por el viento, la lluvia, el rocío o los insectos (Marroquín-Pimentel, 1999). En las hojas, las lesiones son de color rojo y el centro el tejido se cae para dar lugar a la formación de agujeros. Las infecciones en el envés de la hoja inician en la nervadura central, esta superficie de la

hoja es menos susceptible que el haz. Las lesiones en las hojas comúnmente se forman en la parte superior de la copa de los árboles (Pernezny y Marlatt, 2007). Esta enfermedad se ha registrado en los estados de Michoacán, Jalisco, México, Morelos, Guanajuato, Puebla, Querétaro, Nayarit y Tamaulipas (Coria, 2008).

Correa-Suarez (2019) nombra a las infecciones iniciales de la roña como ‘mancha de chapopote’ por el aspecto de la lesión oscura, pequeña y elevada lo que concuerda con lo descrito por Jenkins (1934) y Everett *et al.* (2011). Sin embargo, este nombre común puede confundirse con el daño provocado por *Phyllachora lauri borboniae* (Schweinitz, 1834) = *Phyllachora gratissima* (Hodges, 1969) (Morales-García, 2020), este hongo provoca lesiones circulares o irregulares donde se desarrolla un estroma negro, no obstante, este patógeno se desarrolla únicamente en las hojas del aguacate a diferencia de la roña.

Morales-García (2017), reportó el síntoma de “mancha púrpura”, el cual provoca lesiones iniciales color púrpura que al crecer pasan a una coloración más oscura y que al coalescer dan el aspecto de roña. En la mayoría de los casos los daños no profundizan al interior de la pulpa, aunque en frutos de la variedad Méndez pueden provocar daño al interior del pericarpio y las grietas corchosas son más grandes (3 mm - 1.5 cm de diámetro), que llegan a medir hasta 2 cm de diámetro, de un color violáceo oscuro que cambia a grisáceo en el centro cuando están en desarrollo y al unirse forma el aspecto corchoso como lo describió Jenkins en 1934 (Figura 4).



Figura 4. Síntoma de la “mancha púrpura”, de acuerdo con lo descrito por Morales-García (2017), a) lesiones pequeñas de 3 a 4.5 mm oscuras y elevadas en “frutos canica” 3ª etapa fenológica, b y c) lesiones de 2 y 1.4 cm, respectivamente, que superan a lo reportado por Everett *et al.* (2011), d) síntoma avanzado de mancha púrpura. Fotografías: Hinojosa-Paredes Ángel G.

Con base en lo anterior, se ha creado discrepancias sobre el agente causal de la roña del aguacate, debido a que, en campo el principal problema que se observa son manchas irregulares, color amarillo cremoso, que al crecer y unirse cubren superficialmente la epidermis del fruto dando un aspecto de “cáscara de mamey”, como lo reportan y ejemplifican otros autores como Leyva-Mir (2020), Morales-García (2020) y Becerra-Morales (2019) (Figura 5). Estas lesiones suelen cubrir gran parte o la totalidad del fruto y por la formación de costra se asocia a *E. perseae*.

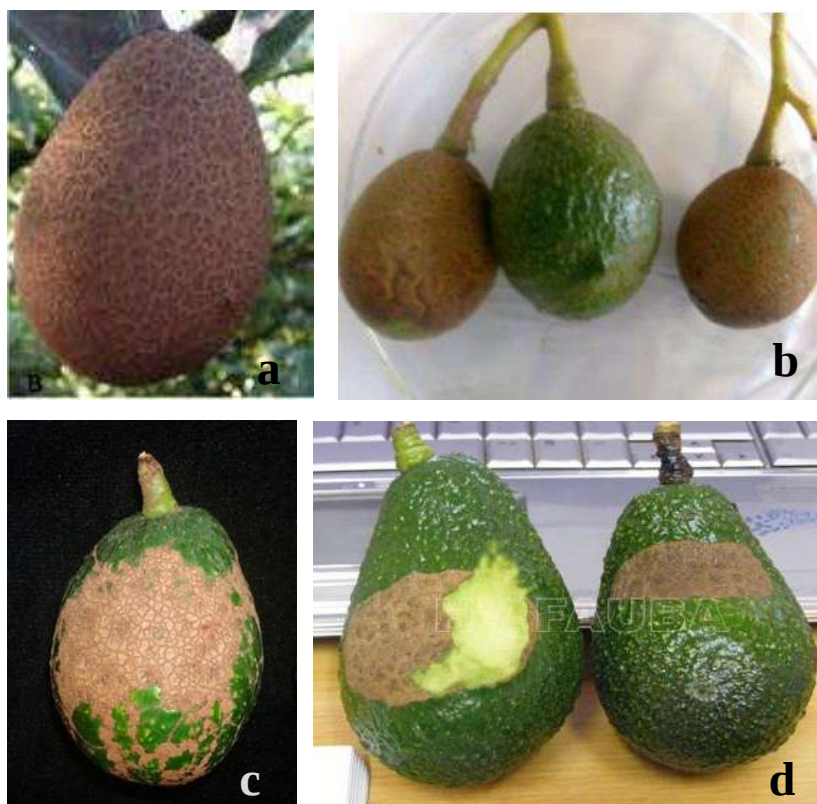


Figura 5. Síntomas de roña reportados en campo, a) roña del aguacate reportado por Morales-García (2020), b) roña del aguacate reportada por Becerra-Morales (2019), c) roña del aguacate reportado Leyva-Mir (2020), d) roña del aguacate, HV- FAUBA, (2021).

En Nueva Zelanda se reportó por primera vez la roña del aguacate en 1991; sin embargo, el registro no fue confirmado por las autoridades fitosanitarias de ese país. Fue hasta 2006 que, Bioseguridad-Australia, un importador de aguacate de Nueva Zelanda (país libre de *E. perseae*) solicitó la revisión de dicho reporte debido al riesgo fitosanitario que implicaba la entrada de este hongo a su país. Los estudios basados en la morfología del hongo y las esporas, junto con el análisis de las secuencias de ADN demostraron que el aislamiento procedente del fruto de aguacate de Nueva Zelanda fue identificado incorrectamente como *E. perseae*. El patógeno aislado se identificó como *Phaeoseptoria* sp., un hongo encontrado comúnmente en especies de la familia Poaceae y no está reportado que ataque al aguacate (Everett *et al.*, 2007) (Figura 6). En las pruebas de patogenicidad no se reprodujeron los síntomas homólogos a *E. perseae* por lo que se determinó que el síndrome de la roña puede ser ocasionado por patógenos diferentes.



Figura 6. Síntomas de roña reportados en Nueva Zelanda provocado por *Phaeoseptoria* sp. a) espécimen del herbario PDD 58048 con síntomas de roña del aguacate descrito por Hartill (1991) erróneamente identificado como *E. perseae*, b) espécimen del herbario PDD 57 autenticado por A.E. Jenkins como síntoma de la roña del aguacate en Florida, c) aguacate con menos de 1 mes de formación procedente de una plantación en Nueva Zelanda mostrando costra. Fuente: Everett *et al.* (2007).

4.5. Identificación filogenética de hongos fitopatógenos

La filogenia tiene como objetivo principal la reconstrucción de las relaciones evolutivas de los seres vivos, basadas en la comparación de caracteres moleculares, fundamentalmente las secuencias de ADN. La filogenia molecular se fundamenta en la teoría de que los cambios de nucleótidos se acumulan en forma constante en el tiempo (García-Sánchez, 2005).

En las últimas dos décadas, se han realizado numerosos cambios en el estudio de la sistemática y de la evolución de los hongos (Redecker, 2002). “La filogenia fúngica siempre se ha basado en caracteres, pero los avances tecnológicos e intelectuales están introduciendo nuevos tipos de caracteres y nuevas formas de analizarlos. La secuenciación alteró progresivamente la manera de ver las relaciones fúngicas. La fenética, la cladística, el análisis de datos computarizados y la generación de árboles filogenéticos están cambiando la taxonomía y filogenia de diversos clados. La combinación de nuevos caracteres y nuevas

herramientas analíticas han apoyado a algunos grupos taxonómicos, han establecido algunos nuevos y han eliminado algunos grupos mal ubicados” (Berbee y Taylor, 2000).

Anteriormente, la filogenia se basaba en caracteres morfológicos, composición de la pared celular, metabolismo celular y registros fósiles (Hawksworth *et al.*, 1995). En las últimas décadas los enfoques cladísticos y moleculares han proporcionado nuevas perspectivas sobre la evolución de los hongos (Boyzo *et al.*, 2014). Actualmente, se utilizan tanto caracteres morfológicos como moleculares para las reconstrucciones filogenéticas.

Los datos moleculares basados en secuencias de ADN son un recurso clave en la identificación de hongos a nivel de especie, independientemente de la etapa de desarrollo en la que se encuentren, si presenta plasticidad morfológica o del medio de cultivo donde se obtenga (Shenoy *et al.*, 2007). La región del ADN más utilizado para estudios filogenéticos de hongos es el ADN ribosómico, el cual se organiza en aproximadamente 200 repeticiones en tándem por núcleo (Butler y Metzenberg, 1989). En esta región se localizan tres genes (18S, 5.8S y 28S) y dos espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) que se transcriben como una sola unidad (Berbee, 2001):

4.5.1. Espacios internos entre transcritos (ITS)

Los genes codificantes de los RNA ribosomales eucarióticos 18S, 5.8S y 28S se encuentran delimitados por fragmentos no codificantes del genoma, denominados espacios internos entre transcritos (ITS por sus siglas en inglés). Para la amplificación de esta región se han diseñado oligonucleótidos cebadores sobre las regiones conservadas de los genes ribosomales (primers de ITS). Esta región del ADN_r se considera como de lenta evolución o altamente conservada, por lo que es útil para el estudio filogenético de organismos a nivel de especie (White *et al.*, 1990).

El ADN_r es el locus más utilizado en investigaciones microbiológicas basadas en secuencias, y se considera uno de los más exitosos en la identificación de hongos (Pérez-Martínez *et al.*, 2013). Entre las regiones del cistron ribosómico, los ITS tienen la mayor probabilidad de éxito en la identificación a niveles taxonómicos más específicos por lo que se considera como un marcador universal en el código de barras para hongos (Schoch *et al.*, 2012).

4.5.2. Gen 28S (Subunidad grande o LSU)

El gen LSU del ADNr tiene una longitud aproximada de 3400 pares de bases y a pesar de ser una secuencia muy conservada posee regiones que son más variables que otras a las que se les han denominado dominios (Moncalvo *et al.*, 2000). Estos dominios variables se han empleado para la inferencia filogenética a diferentes niveles taxonómicos (Suh y Blackwell, 1999).

Bagsic *et al.* (2016) desarrollaron un par de cebadores que amplifican una parte del gen de la subunidad grande (LSU) del 28S ARNr a partir de 24 secuencias de las especies de *Elsinoe* y *Sphaceloma* disponibles en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), con el fin de identificar filogenéticamente aislados de *E. rosarum*.

4.5.3. Factor de elongación 1-alfa

El factor de elongación 1-alfa (EF-1 α) es un gen que codifica una proteína abundante y altamente conservada y es un elemento clave en la traducción de proteínas eucariotas. El EF-1 α tiene una longitud aproximada de 300 pares de bases y el indel de 3 pb en el sitio 55 es filogenéticamente informativo, (Suarez *et al.*, 2006). El factor de elongación es un mediador para la entrada del aminoacil ARNt al sitio A de los ribosomas en el proceso de traducción de las proteínas y son imprescindibles para que el ribosoma pueda llevar a cabo la traducción genética (Slobin, 1980).

En las células eucariotas, el EF-1 α es la proteína más abundante después de la actina, se puede presentar en múltiples copias en los phylum Ascomicota y Zygomycota. Este gen posee la capacidad de determinar relaciones filogenéticas a nivel de especie (Roger *et al.*, 1999). Actualmente el EF-1 α es considerado como un gen esencial en análisis multigénicos en una amplia variedad de hongos (Geiser, 2004).

5. METODOLOGÍA

5.1. Colecta de material vegetal

Para la colecta del tejido vegetal enfermo se realizaron muestreos dirigidos en 23 huertos comerciales de aguacate (Cuadro 1). La colecta de frutos se basó en la producción de capas de corcho o corchosis en el pericarpio, que es la principal característica del síntoma de roña (Figura 7). Los frutos con presencia de plagas o con indicios de daños mecánicos se descartaron aunque presentaran síntomas similares a la roña.

Cuadro 1. Geoposicionamiento de los sitios muestreados para la colecta de frutos de aguacate con síntomas de “roña” y “mancha púrpura”.

ESTADO	MUNICIPIO	HUERTA	MANEJO	COORDENADAS
Michoacán	San Juan Nuevo	“Mi Ranchito”	Convencional	19.3478302, -102.22269
Michoacán	San Juan Nuevo	“Flor Canela”	Convencional	19.4443646, -102.1719648
Michoacán	San Juan Nuevo	“Zurucuaru 2”	Semiorganico	19.4443646, -102.1719648
Michoacán	Uruapan	“Fresno 10”	Convencional	19.3822905, -102.0729645
Michoacán	Tingambato	“Norteña”	Convencional	19.4867995, -101.919872
Michoacán	Uruapan	“Tanaxuri”	Orgánico	19.3847245, -102.0959188
Michoacán	Uruapan	“Traspatio”	Orgánico	19.3948145, -102.059186
Michoacán	San Juan Nuevo	“Zacándaro”	Convencional	19.359440, -102.185830
Michoacán	Peribán	“Copetiro”	Convencional	19.4578149, -102.4564097
Michoacán	Uruapan	“Tiamba”	Convencional	19.490001, -102.032222
Michoacán	San Juan Nuevo	“La Hierbabuena 6”	Convencional	19.359443, -102.185833
Michoacán	San Juan Nuevo	“Las Joyitas”	Convencional	19.359444, -102.185833
Michoacán	San Juan Nuevo	“Valle Verde”	Convencional	19.44633, -102.17218
Michoacán	San Juan Nuevo	“Las Mesas”	Convencional	19.4166, -102.15166
Michoacán	San Juan Nuevo	“Milpillas”	Convencional	19.41599, -102.14993
Michoacán	San Juan Nuevo	“La Loma 10”	Convencional	19.41617, -102.13993
Michoacán	Parácuaro	“Ordeñitas”	Convencional	19.236000, -102.189445
Michoacán	Tancítaro	“Citlalli”	Convencional	19.650, -101.8332
Michoacán	Ario de rosales	“La Lagunilla 8”	Convencional	19.152182, -101.775891
Jalisco	Ciudad Guzmán	“Jacarandas”	Convencional	19.593124, -103.468360
Jalisco	Tuxpan	“Canoas II”	Convencional	19.627290, -103.466695

Continuación cuadro 1.

ESTADO	MUNICIPIO	HUERTA	MANEJO	COORDENADAS
Jalisco	Tuxpan	“Canoas I”	Convencional	19.583180, -103.470207
Jalisco	Ciudad Guzmán	“Las Carmelitas”	Convencional	19.66175, -103.52633

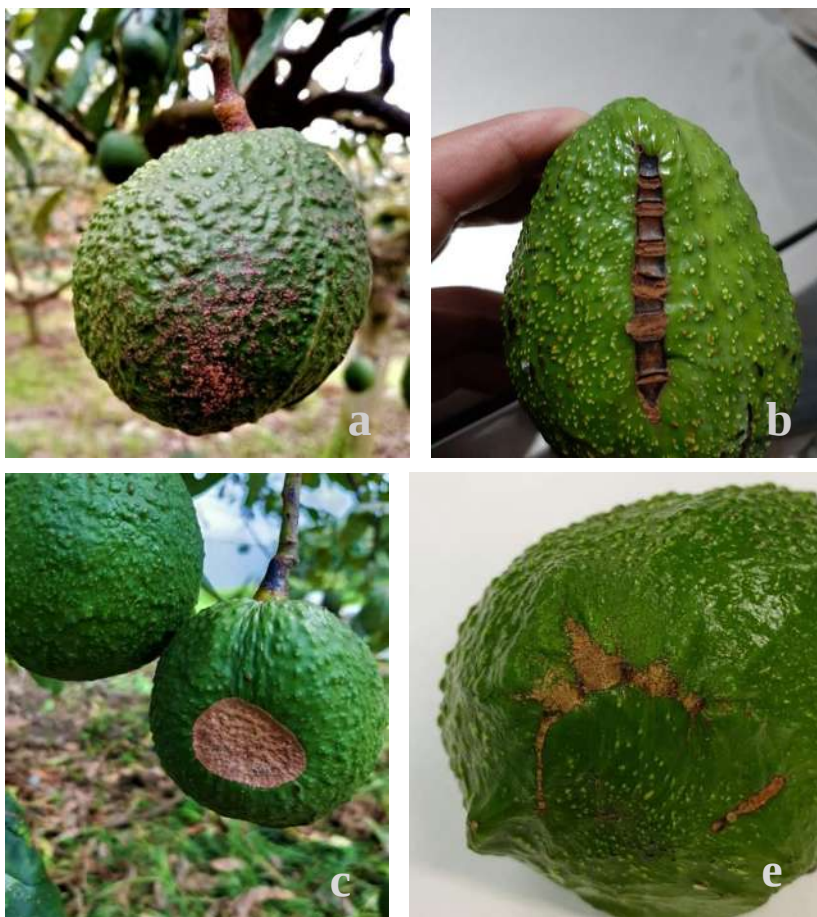


Figura 7. Tipos de roña provocado por diferentes agentes causales, a) daño severo por alta incidencia de ácaros, b) síntoma por daño mecánico, c) síntomas por mordedura de larvas. Fotografías: Hinojosa-Paredes A., d) daño severo por trips.

Con base en los criterios de monitoreo de enfermedades que realizan los técnicos en campo y con las descripciones del síntoma reportadas por Jenkins (1934), Everett *et al.* (2011) y Fan *et al.* (2017), se identificaron dos síntomas diferente de roña, uno llamado comúnmente “roña típica” y otro “mancha púrpura”. En cada punto de muestreo se colectaron ocho frutos de cada síntoma (Figura 8). Las muestras se colocaron en bolsas de papel kraft para evitar el

aumento de humedad y con esto el crecimiento de hongos saprófitos. Posteriormente, en el laboratorio se tomaron al azar tres frutos para realizar la siembra en cajas Petri con medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA, BIOXON®), como se describe en el siguiente apartado.

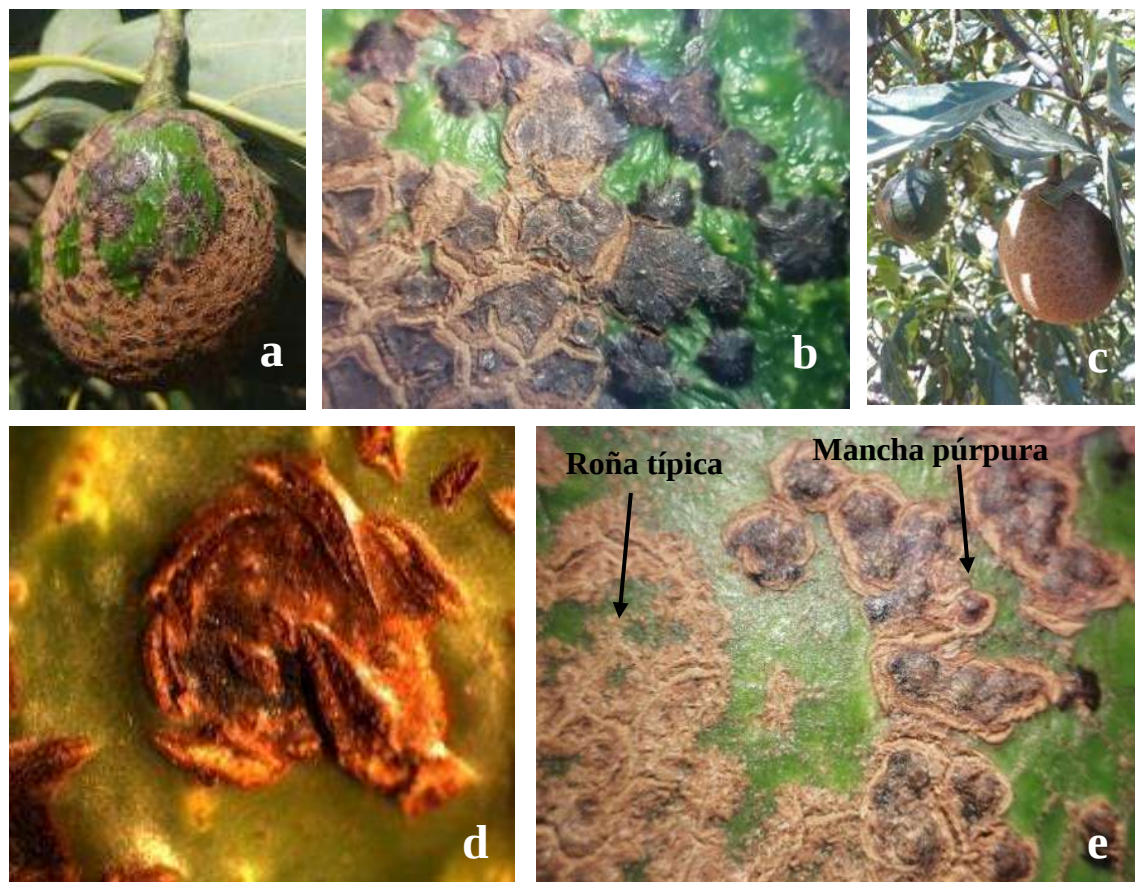


Figura 8. Síntomas de roña en los frutos colectados, a) síntoma avanzado de “mancha púrpura” en campo, b) vista del síntoma de “mancha púrpura” al microscopio estereoscópico, c) síntoma avanzado de “roña típica” en campo, d) vista al microscopio estereoscópico del síntoma inicial de “roña típica”, e) vista al microscopio estereoscópico de ambos síntomas presentes en un fruto.

5.2. Aislamiento

Para los aislamientos, se tomaron tres frutos al azar de cada síntoma de las muestras de material enfermo y se sembraron tres cajas Petri para cada fruto, se obtuvo un total de 207 cajas Petri tanto para el síntoma de “roña típica” como para el síntoma de “mancha púrpura”. El protocolo de desinfección se basó en el trabajo de Zhi *et al.* (2018) modificado por Correa-Suarez (2019), el cual consistió en limpiar superficialmente los frutos de aguacate con agua destilada estéril para eliminar posibles contaminantes presentes sobre el pericarpio.

Posteriormente, se cortaron trozos de tejido vegetal de 5 mm² aproximadamente (de la zona de avance del síntoma); después, se sumergieron a una solución hipoclorito de sodio al 6% durante 90 segundos seguido de un enjuague con agua destilada estéril. Enseguida se realizó una segunda desinfección con etanol al 70% durante 60 segundos y dos enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, los trozos de tejido se colocaron en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de agua y se pusieron cinco fragmentos de tejido distribuidos de manera equidistante en las cajas axénicas con medio de cultivo PDA. Las cajas, se etiquetaron con el sitio de colecta, tipo de síntoma y la fecha de siembra y se sellaron con papel parafilm®. Posteriormente, las cajas se colocaron en incubadora a temperatura constante de 28 °C, la humedad relativa se mantuvo a 100% dentro de la caja. El crecimiento de los hongos se monitoreó diariamente para realizar los reislamientos por punta de hifa, que se realizó en cuanto se observó crecimiento micelial para así garantizar el crecimiento de cepas monospóricas (Figura 9).

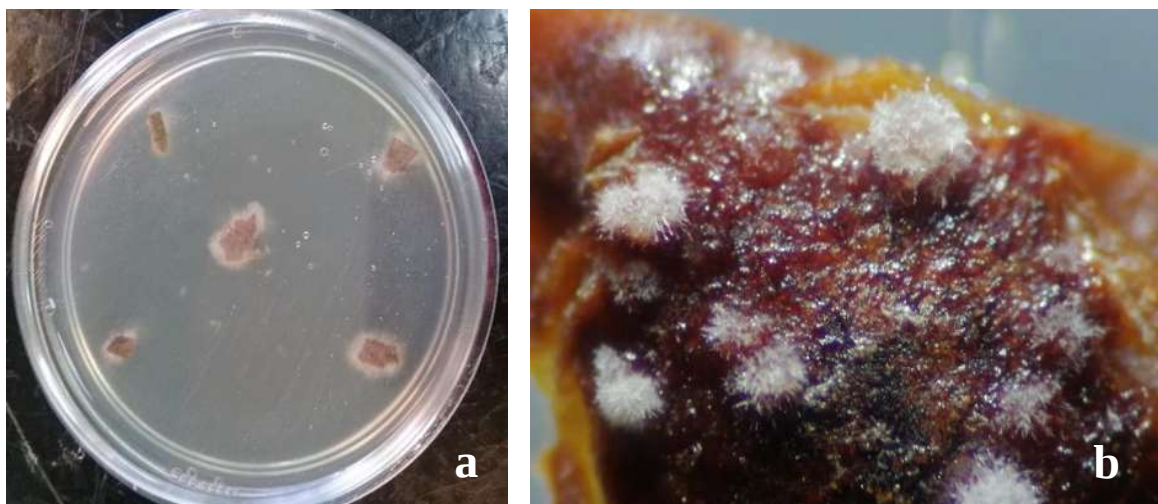


Figura 9. Monitoreo del crecimiento micelial del tejido vegetal sembrado, a) crecimiento de la colonia aislada del tejido vegetal con síntoma de roña, b) desarrollo de hifas sobre síntoma de mancha púrpura visto al microscopio estereoscópico.

5.3. Identificación morfológica

Una vez obtenidas las colonias puras, se procedió a la identificación morfológica con ayuda de las claves taxonómicas especializadas de Barnett y Hunter (1998). Los aspectos evaluados fueron la forma de la colonia (moho o levaduriforme), color de la colonia, elevación, pigmentación del medio y velocidad de crecimiento. Mientras que microscópicamente se

evaluó el tipo de micelio (cenocítico o septado) y la presencia de estructuras de reproducción como la forma de los conidios o presencia de clamidosporas en la fase asexual (anamorfo) y la presencia de ascocarpos o ascosporas en la fase sexual (teleomorfo) (Hyde, 2010). Para esto, se realizaron montajes fijos y temporales de fragmentos de micelio y estructuras reproductivas en cubreobjetos usando lactofenol como colorante. Además, se realizaron cortes de tejido vegetal con síntomas de roña para ser observados en el microscopio óptico (Leica DM750 P, Wetzlar, Alemania) y poder comparar las estructuras con las reportadas en la literatura para cada género.

5.4. Identificación molecular

Las cepas de hongos puras aisladas anteriormente se trasladaron al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Zapopan, Jalisco. Se comenzó con el crecimiento de las colonias en medio líquido (Agar Dextrosa Saboraud) para facilitar el proceso de extracción del ADN. El primer paso de la extracción consistió en la ruptura de la pared y la membrana celular para la liberación del contenido celular. La muestra de micelio se pulverizó con nitrógeno líquido, se colocó en tubos de microcentrífuga de 2mL y se conservó a -80 °C para evitar la degradación del ADN por acción de nucleasas.

Posteriormente, a cada tubo con tejido molido (aproximadamente 250 mg) se le agregó 1 mL de la solución amortiguadora CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 2%, previamente calentado a baño María a 65 °C por aproximadamente 20 min. En seguida se mezcló por inversión para la homogenización del tejido con la solución y se incubó a baño María a 65 °C durante 90 min, para favorecer la lisis celular.

Una vez concluido el periodo de incubación, se agregaron a la muestra 500 µL del disolvente orgánico cloroformo-álcohol isoamílico (en proporción 24:1) y se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. En seguida, los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min para favorecer la desnaturalización y la separación de proteínas. En este paso se forma la fase orgánica y la fase acuosa, en esta última se encuentra el ADN. Posteriormente, se recuperó 650 µL de la fase acuosa, con el cuidado de no mezclarla nuevamente con la fase orgánica y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

El siguiente paso fue la precipitación del ADN, para esto se agregó $\frac{1}{2}$ volumen (325 μL) de isopropanol refrigerado a 4 °C al tubo donde se recuperó la fase acuosa, se mezcló por inversión y en caso de no observar la precipitación de las hebras de ADN, la muestra se incubó a -20 °C durante 1 hora. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se centrifugó a 5000 rpm por 30 min para empaquetar el ácido nucleico en el fondo del tubo, formando una pastilla. Después del proceso de centrifugación, se eliminó el sobrante por decantación y se agregó 1 mL de etanol al 70% para lavar la pastilla y eliminar posibles contaminantes. El tubo se agitó para desprender la pastilla del fondo y se centrifugó a 5000 rpm durante 8 min, este proceso se repitió dos veces. Después de la segunda centrifugación se eliminó el etanol por decantación y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, se agregó 100 μL de agua destilada estéril a cada tubo y se colocaron a baño María a 65°C por 10 minutos para resuspender la pastilla de ADN. A continuación, se verificó la calidad del ADN mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1.0%.

En cuanto se confirmó la presencia del ADN genómico, se cuantificó la concentración, colocando 1 μL de la muestra en el espectrofotómetro (NanoDrop One, Thermo scientific, Massachusetts, EUA). Con este dato se procedió a realizar las diluciones para ajustar la concentración de ADN genómico a 20 ng/ μL . Posteriormente, se realizó una amplificación por PCR, usando diferentes pares de primers (ITS-5/ITS-4, ITS1/ITS4, EF-1 α F/ EF-1 α R y Sph1F / Sph1R) (Cuadro 2). Las amplificaciones de los productos de la PCR se verificaron por electroforesis de 5 μL de muestra en un gel agarosa al 1.5%. La purificación de los productos de PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) (Figura 10). Los fragmentos amplificados se enviaron al laboratorio de Macrogen, Seúl, Corea del Sur para su secuenciación.

Cuadro 2. Primers utilizados para la amplificación e identificación molecular de los aislados fúngicos.

Primer	Secuencia	Región de amplificación	Referencia
ITS 1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	Espacio interno entre transcritos (ITS)	White <i>et al.</i> (1990)
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
ITS 5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'		
EF-1 α F	5'-AGCCCCTCCGTCTTCCTCTCCAG-3'	Factor de elongación 1-alfa	Hyun <i>et al.</i> (2009)
EF-1 α R	5'-CGGTACGGCGGTCAATCTTCTCG-3'		
Sph1 F	5'-CAGGGATTGCCTCAGTAACG-3'	Dominio de la subunidad grande 28 S (LSU)	Bagsic <i>et al.</i> (2016)
Sph1 R	5'-TTTCCTCTGGCTTCACCCTA-3'		

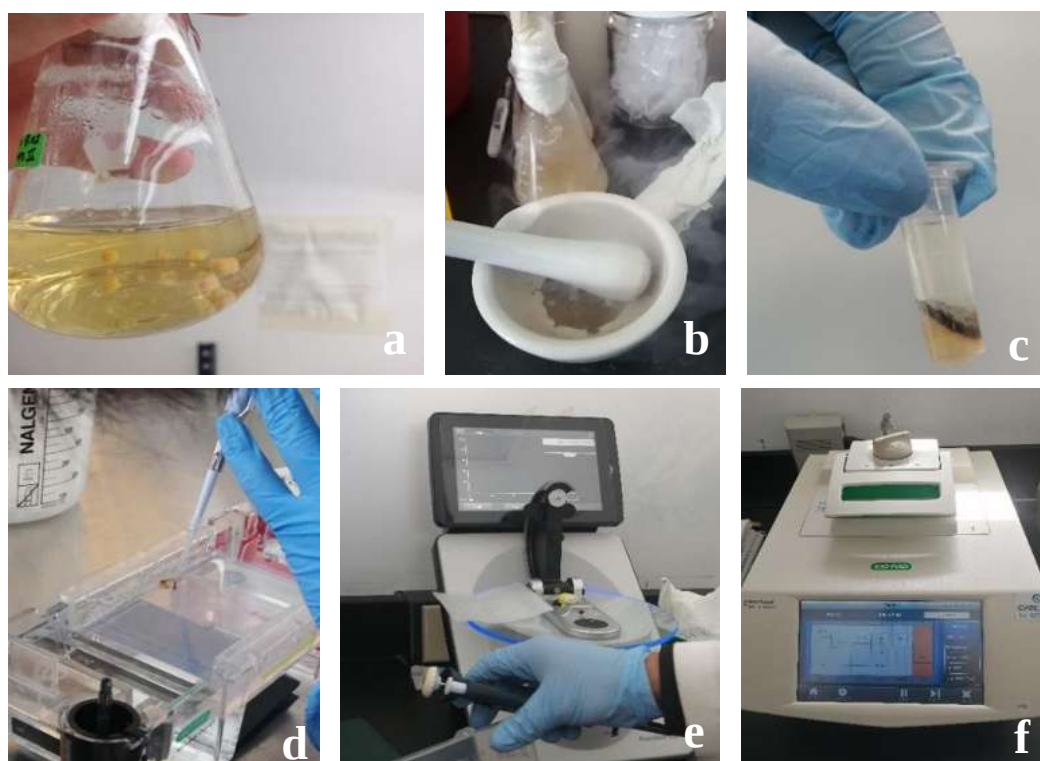


Figura 10. Desarrollo de las actividades para la identificación molecular de los hongos aislados de frutos de aguacate con síntomas de “roña típica” y “mancha púrpura”, a) crecimiento de la colonia en medio líquido, b) macerado de tejido con nitrógeno líquido, c) resultado de la separación de la fase acuosa y la fase orgánica, d) electroforesis para la verificación de la calidad del ADN genómico, e) cuantificación del ADN genómico en el espectrofotómetro, f) amplificación de los fragmentos de ADN por PCR en el termociclador.

Una vez que se obtuvieron los resultados de la secuenciación, se revisaron los electroferogramas para verificar la calidad de las secuencias. Posteriormente, las secuencias bidireccionales se alinearon con el programa Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) y se corroboraron en BioEdit (Hall, 1999) con la finalidad de obtener una secuencia consenso. Para obtener la identificación a nivel de especie, se realizó una comparación de similitud con secuencias ya depositadas en el NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, por sus siglas en inglés), mediante la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool).

Para robustecer la identidad a nivel de especie, se realizó un análisis filogenético multilocus para las cepas identificadas como *E. perseae*, utilizando las secuencias obtenidas con los primers ITS5/ITS4 o ITS1/ITS4, SPh1 F/SPh1 R (LSU) y EF-1 α F/ EF-1 α R. Para este análisis se utilizaron secuencias de especies del género *Elsinoe* ya depositadas en la base de datos del GenBank. En el caso de las cepas aisladas de “roña típica” se realizó un análisis basado en la secuenciación de los primers ITS4/ITS5.

Una vez obtenidas las secuencias consenso, estas se compilaron en formato FASTA. Después, las secuencias se alinearon con el programa MAFFT v.7.475 (Katoh y Standley, 2013). Las secuencias de los genes LSU, EF-1 α e ITS obtenidas de las cepas identificadas como *E. perseae* se concatenaron en el programa MESQUITE v.3.6 (Maddison y Maddison, 2016). El análisis filogenético se basó en el algoritmo de Inferencia Bayesiana (BI), previamente se determinó el modelo evolutivo en el programa JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). Para generar los árboles filogenéticos, se utilizó el programa MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012), utilizando el método de Markov Monte Carlo (MCMC) con cuatro cadenas y partió de una topología de árbol aleatorio, muestreando cada 1000 generaciones.

5.5. Pruebas de patogenicidad

Para evaluar la patogenicidad de las cepas obtenidas, se utilizaron plantas de aguacate criollas, así como de las variedades Hass y Flor de María de vivero de aproximadamente 18 meses de haber sido injertadas. Un mes previo a la inoculación, las plantas se trataron con fungicidas químicos (Tecto 60[®] y Uniform[®]), para eliminar posibles patógenos presentes en la planta que pudieran afectar los resultados de las pruebas. Las plantas se mantuvieron al

aire libre, se regaron cada cuatro días con 3 L de agua por planta y se fertilizaron cada 15 días con una mezcla de fertilizante marca Entec 24-08-07 (6 gramos por planta).

Se realizaron dos tipos de inoculación: directa e indirecta. La primera consistió en realizar heridas en el pericarpio del fruto y en los tallos jóvenes con un alfiler entomológico del número 0, para después colocar discos de micelio de aproximadamente 1cm de diámetro sobre la herida, posteriormente se cubrió con algodón humedecido con agua destilada estéril y plástico “kleen pack”. Se colocó una bolsa plástica a manera de cámara húmeda, los discos se retiraron al tercer día de la inoculación.

En el método indirecto se realizaron pequeñas heridas a los frutos y a las ramas jóvenes; después se asperjó una solución con conidios, esporas y fragmentos de micelio a una concentración de 1×10^6 propágulos mL^{-1} que se preparó según lo reportado por Gilchrist-Saavedra *et al.* (2005). Este procedimiento consistió en la extracción de las estructuras de fructificación de los hongos o del micelio aéreo de las cajas Petri donde se crecieron. El tejido fúngico se licuó en 50 mL de agua destilada estéril. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en la cámara Neubauer, se colocó un cubreobjetos y se realizó el conteo en un microscopio óptico. Una vez que se ajustó a la concentración deseada, la solución se colocó en un aspersor manual. Por último, la planta se cubrió con una bolsa plástica a manera de cámara húmeda. En las diferentes variedades se evaluó la incidencia del síntoma y se realizó un reaislamiento para comparar las cepas obtenidas con las inoculadas inicialmente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Aislamientos

De acuerdo a la descripción de Antonelli (1980) y Cruz-Borrueal *et al.* (2006) sobre la producción de capas de corcho por mecanismo de defensa de las plantas, se identificaron seis tipos de síntomas de roña en campo y se asociaron a diversos agentes bióticos y abióticos. Los síntomas se caracterizaron de acuerdo a los reportes de Rosen (1990) y SENASICA (2018) como daños por plagas, daños mecánicos y agentes fitopatógenos. Los síntomas conocidos en campo como “roña típica” y “mancha púrpura” se seleccionaron para la evaluación.

De los frutos con síntoma de “roña típica” se obtuvieron 17 cepas con características morfológicas diferentes. De las muestras colectadas en Michoacán se aislaron 16 cepas con características coloniales disímiles y se identificaron morfológicamente ocho a nivel de género. Para las muestras colectadas en Jalisco se obtuvieron cinco cepas con características coloniales diferentes y se identificaron cuatro morfológicamente a nivel de género (Cuadro 3). Del síntoma de “mancha púrpura” se aislaron tres cepas morfológicamente diferentes, éstas se aislaron de muestras tanto del estado de Michoacán como de Jalisco (Cuadro 4). La identificación morfológica se efectuó con el uso de las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998).

Cuadro 3. Cepas identificadas morfológicamente, aisladas del síntoma de “roña típica”.

MICHOACÁN	JALISCO
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp
<i>Curvularia</i> sp.	
<i>Fusarium</i> sp.	
<i>Epicoccum</i> sp.	
<i>Leptosphaerulina</i> sp.	

Cuadro 4. Cepas identificadas morfológicamente, aisladas del síntoma de “mancha púrpura”.

MICHOACÁN	JALISCO
<i>Elsinoe</i> sp.	<i>Elsinoe</i> sp.
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.

6.1.1. Síntoma de “roña típica”

De la siembra del tejido vegetal con síntoma de “roña típica” se obtuvieron 16 cepas diferentes, 8 se identificaron morfológicamente como posibles hongos fitopatógenos, los cuales corresponden a los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* y *Epicoccum*. De éstos, el género *Colletotrichum* fue el más representativo, ya que su crecimiento se observó 90 % de las cajas sembradas (n = 207), seguido de *Pestalotiopsis* con 40%, el resto de los hongos se presentaron de forma esporádica que no superaron el 3% (Figura 11). Estos datos concuerdan con los trabajos de Djeugap *et al.* (2015), Alfaro-Espino (2017) y Becerra-Morales (2019), quienes reportan la presencia de especies del género *Colletotrichum* con mayor frecuencia en aislamientos del síntoma de roña.

Con base en los estudios realizados por Hernández y Gonzáles (2010) y Pérez-Álvarez *et al.* (2016), se descartaron las ocho especies restantes por su menor frecuencia de desarrollo de colonias (presencia en un máximo en tres cajas sembradas), así como por la identificación como hongos contaminantes para el caso de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*, también se consideró la velocidad de crecimiento y la ausencia de estructuras reproductivas.

En la identificación morfológica de la cepa con mayor frecuencia de crecimiento, se observó el desarrollo de colonias blancas con el centro gris, de textura algodonosa, con producción de masas conidiales de color naranja en el centro. Se caracterizó por ser una colonia de rápido crecimiento (en ocho días cubrió la caja Petri de 15 cm de diámetro). En sus características microscópicas, se observó micelio septado, conidios unicelulares alargados, casi cilíndricos con un ligero estrechamiento en el centro, que da la apariencia de un septo y con extremos redondeados (Barnett y Hunter, 1998). Estas características coinciden con las referidas para el género *Colletotrichum* perteneciente al Phylum Ascomycota, Clase Hypocreomycetidae y Orden Glomerellales (Agrios, 2005).

La segunda cepa con mayor porcentaje de crecimiento, sobre todo en muestras provenientes de Jalisco, desarrolló colonias blancas de micelio septado con un crecimiento rosetado. Además, se observó el desarrollo de cuerpos fructíferos de color negro que presentaron

conidios multicelulares fusiformes (de 3 a 5 células) con tres flagelos apicales y uno basal (Barnett y Hunter 1998), estas características coincidieron con las referidas para el género *Pestalotiopsis* que pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes y Orden Xylariales (Agrios, 2005).

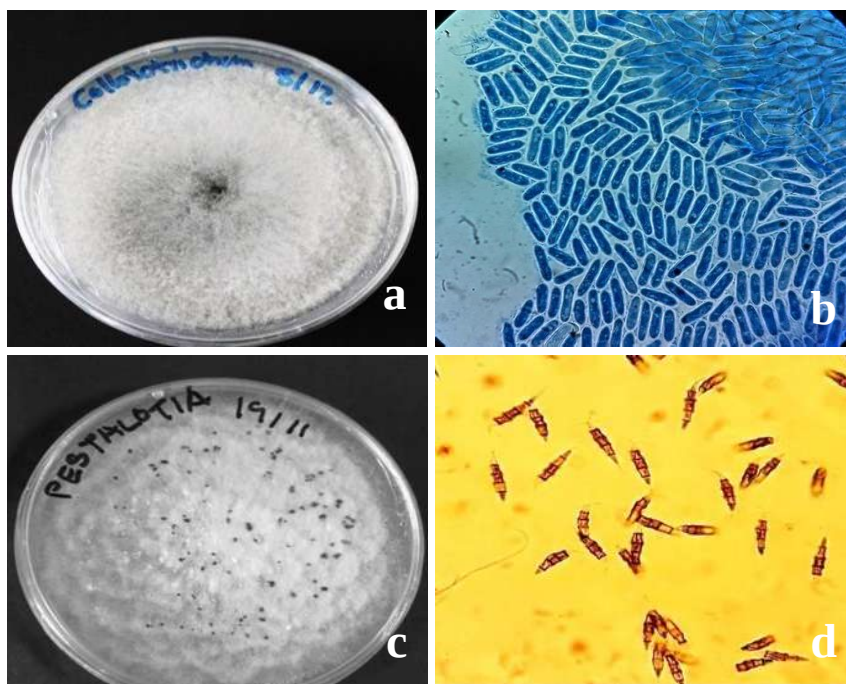


Figura 11. Colonias con mayor porcentaje de aparición, obtenidas de frutos con síntoma de “roña típica”, a) colonia fúngica identificada morfológicamente como *Colletotrichum* sp., b) estructuras de reproducción (conidios) característicos del género *Colletotrichum*, c) colonia fúngica identificada morfológicamente como *Pestalotiopsis* sp. con masas de conidios negras, d) conidios fusiformes característicos del género *Pestalotiopsis*.

6.1.2. Síntoma de “mancha púrpura”

En el tejido vegetal con síntoma de “mancha púrpura” se obtuvieron colonias identificadas morfológicamente como *Elsinoe* sp. principalmente, con crecimientos esporádicos (1-2%) de *Colletotrichum* sp. y *Alternaria* sp. En las colonias identificadas como *Elsinoe* sp., la determinación se realizó mediante la morfología colonial, así como por sus estructuras de reproducción, para lo cual, se tomó como referencia la cepa ATCC 11190 (*E. persea*) depositada en el cepario de Miami, Florida, EUA y que fue facilitada por el CIATEJ (Figura 12). Además, se consideraron las descripciones de diferentes grupos de investigación sobre

otras especies del género *Elsinoe* (Everett *et al.*, 2011; Korsgaard *et al.*, 2014; Ayala-Escobar *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2017; Zhi *et al.*, 2018).

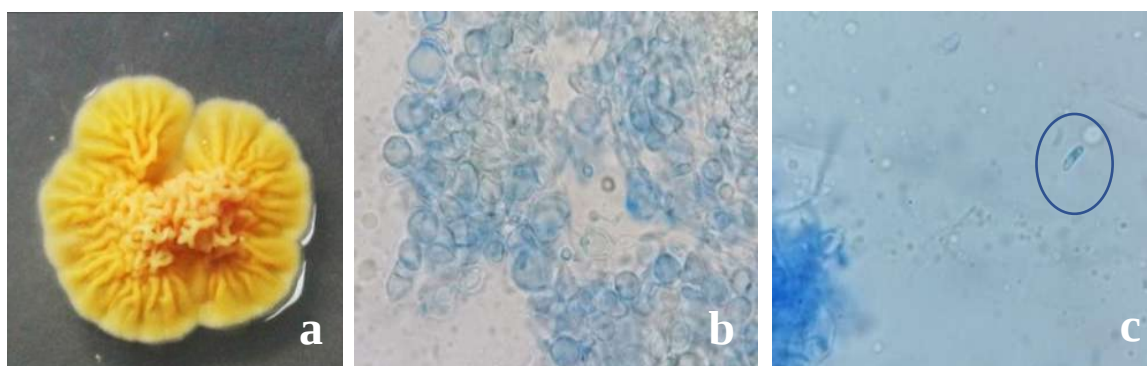


Figura 12. Cepa de referencia ATCC 11190 de *E. perseae*, a) colonias cerebroides de dos meses de crecimiento, b) micelio septado toruloso, c) conidio pequeño (3 µm), similar a los del género *Colletotrichum*.

Del tejido vegetal con síntoma de “mancha púrpura” se desarrollaron colonias de crecimiento micelial en estroma de tipo cerebroide principalmente, y algunas de crecimiento viscoso o pulvinado (Figura 13) que coincidieron con la descripción de Bitancourt y Jenkins (1941) como variaciones de crecimiento para *E. perseae*. Al inicio del desarrollo de la cepa, se observaron colonias, generalmente de color amarillo pajiso a anaranjado y conforme se realizaron reaislamientos se observó una plasticidad en la morfología colonial que permitió el desarrollo de colonias de múltiples colores y elevaciones (Figura 14). Esto contradice lo reportado por Correa-Suárez (2019), quien asocia estas diferencias morfológicas con morfotipos; sin embargo, en esta investigación se observó que una cepa puede variar su coloración y forma con la edad y si se transfiere a cajas Petri en varias ocasiones. Se apreció que son colonias de lento crecimiento, alcanzan un promedio de 2.5 cm de diámetro en dos meses de incubación a 28 °C, lo que coincide con lo reportado por Jenkins (1934).

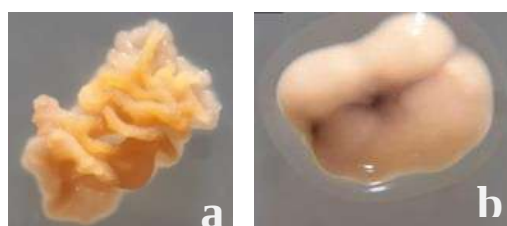


Figura 13. Variación en el tipo de crecimiento de los aislamientos de *E. perseae*, a) crecimiento de tipo cerebroide, en colonias de dos semanas, b) crecimiento viscoso o pulvinado, en colonias de dos semanas.

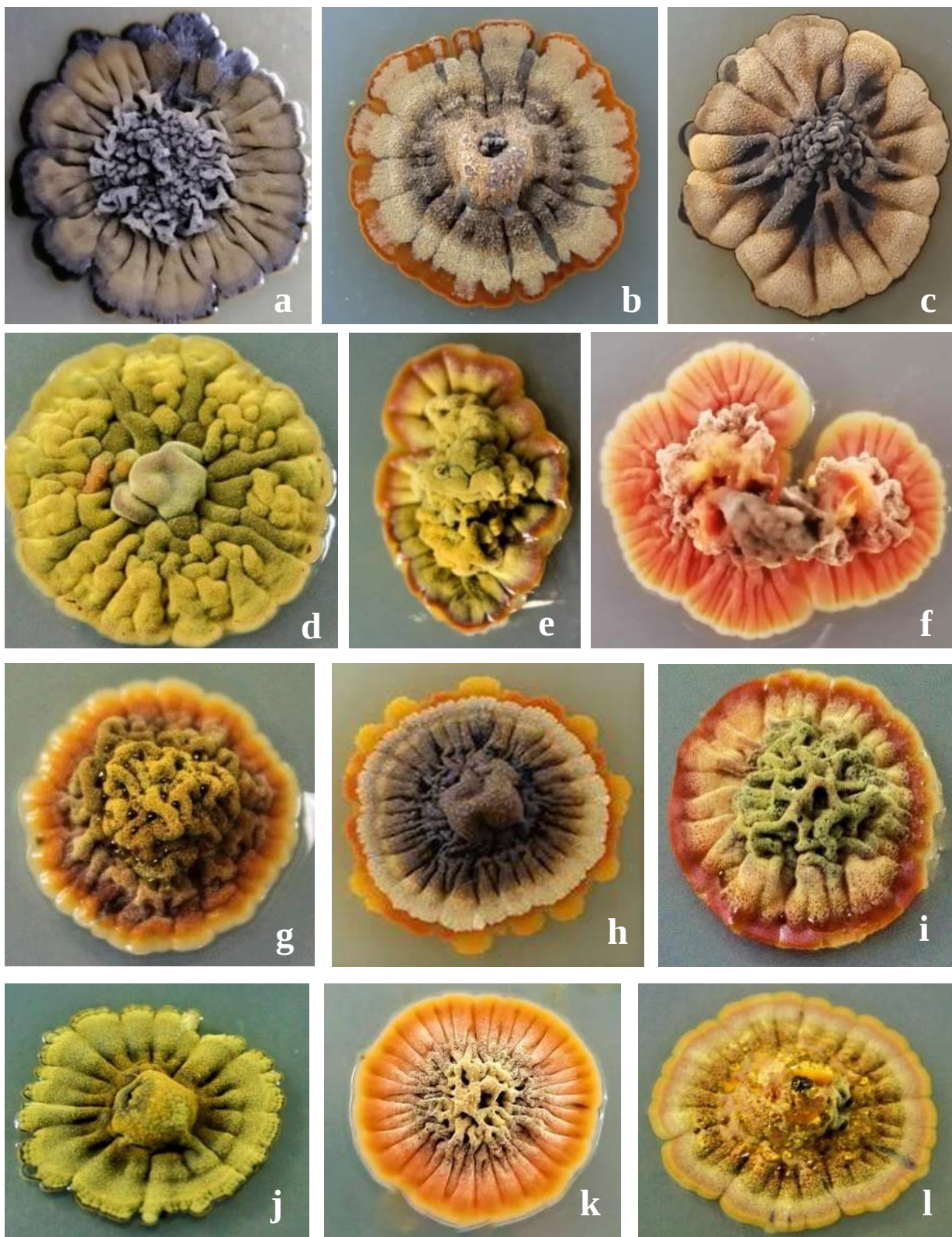


Figura 14. Cepas identificadas morfológicamente como *Elsinoe* sp., a) - l) plasticidad morfológica de las cepas de *Elsinoe* sp. después de su reislamiento.

En las estructuras del hongo identificado como *Elsinoe* sp., se observó que al inicio del desarrollo, el hongo presentó micelio filamentoso que posteriormente se transformó en micelio toruloso, después se compactó hasta formar el estroma que da el aspecto cerebroide a la colonia. Los conidios fueron pequeños (3-4 μm), ovalados y se observaron en mayor cantidad al inicio del desarrollo de las colonias, una vez que la colonia desarrolló el estroma se dificultó la identificación de los conidios.

En las preparaciones obtenidas de las cepas de dos meses de desarrollo *in vitro*, se observaron monofiálides simples de aproximadamente 9 a 12 μm de longitud (Figura 15), estas estructuras no han sido reportadas en investigaciones previas de la especie.

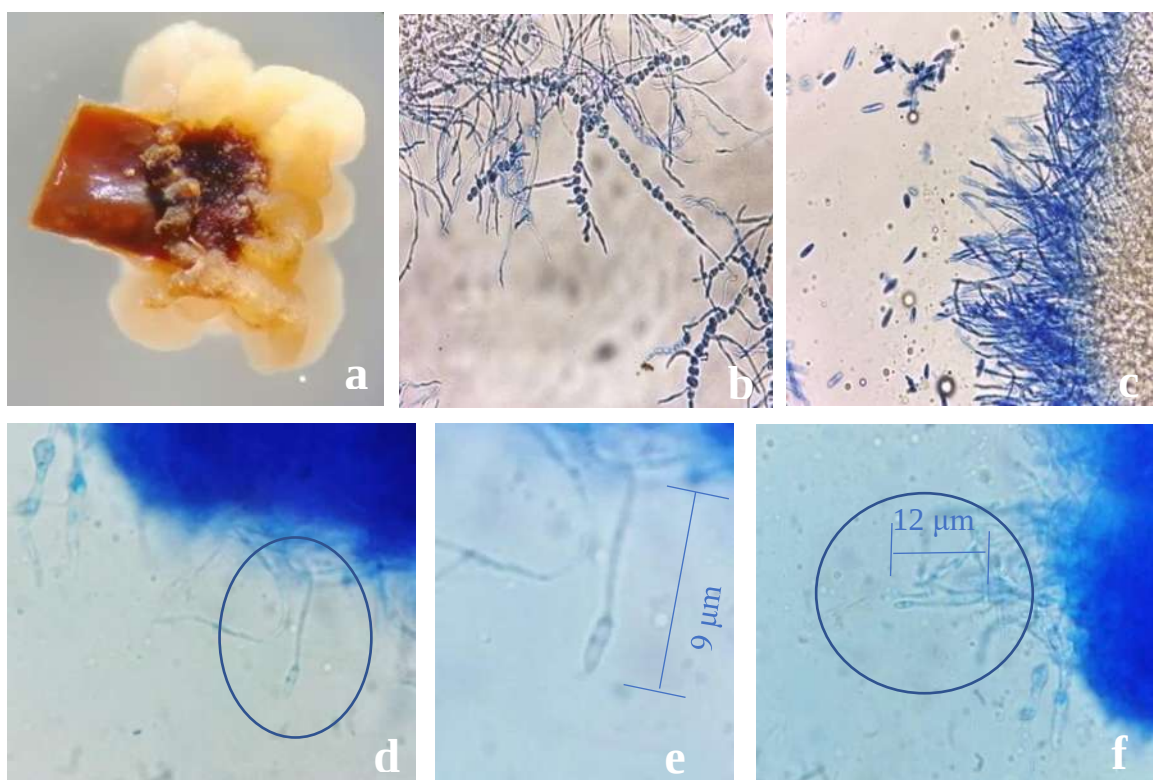


Figura 15. Identificación morfológica de *Elsinoe* sp., a) germinación del micelio estromático del tejido vegetal, b) micelio septado de crecimiento toruloso, c) conidios pequeños similar a los del género *Colletotrichum*, observado en los primeros días de crecimiento, antes de formarse el estroma, d), e) y f) presencia de monofiálides con conidio en el extremo.

Además de la identificación morfológica, se realizaron cortes histológicos del tejido vegetal con síntomas de “mancha púrpura”. Se observaron estructuras asexuales a manera de acérvulos (Jenkins y Bitancourt, 1941) y micelio en proceso de germinación que posteriormente se especializará en conidióforos libres, lo que concuerda con lo descrito por Jenkins (1934), sobre las estructuras de reproducción asexual de *E. perseae* en el tejido infectado (Figura 16).

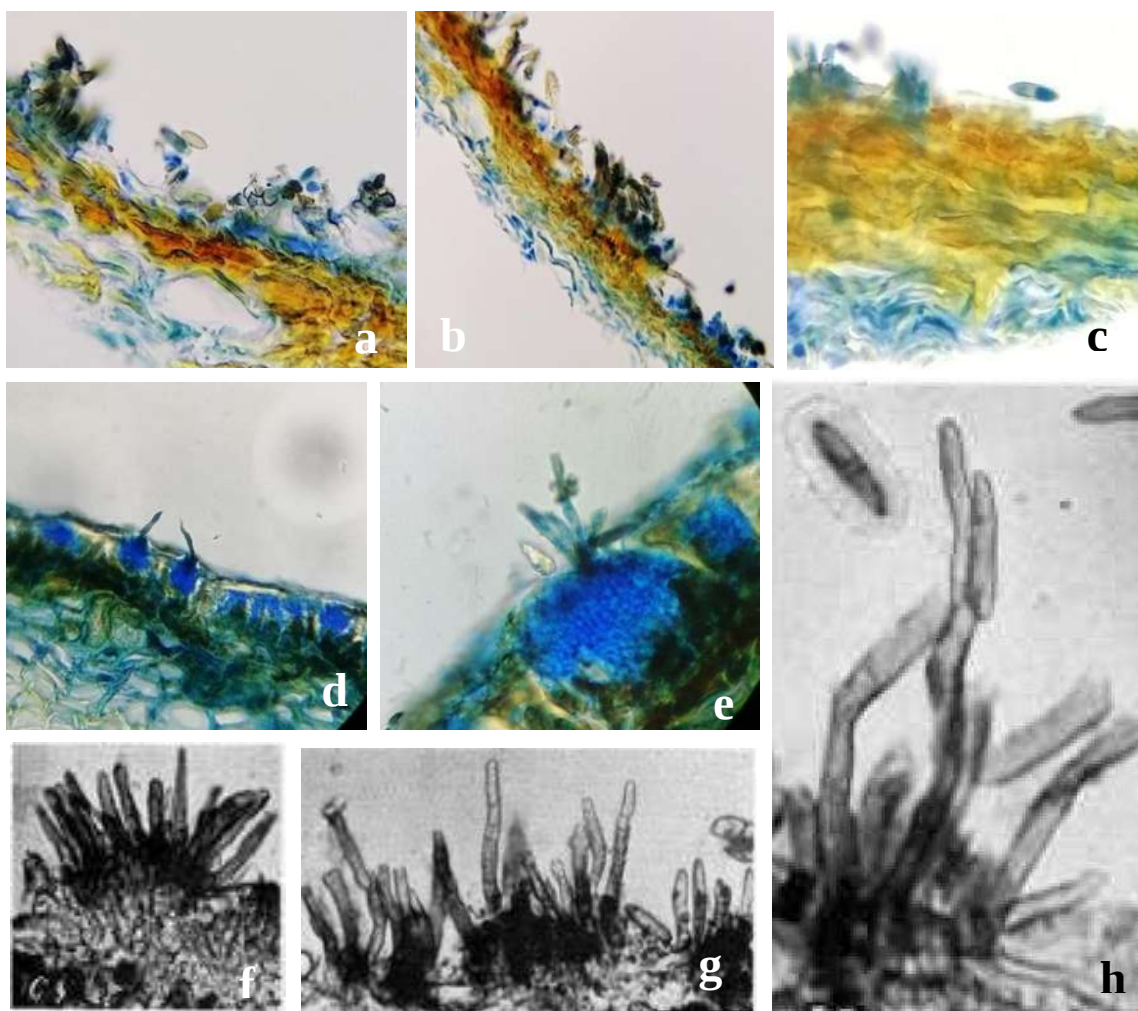


Figura 16. Cortes histológicos en fruto de aguacate con síntoma de “mancha púrpura”, a), b) y c) presencia de conidióforos libres y conidios pequeños similares a los del género *Colletotrichum*, d) y e) presencia de acérvulos con micelio germinando, visto a 40 X (a, b y d) y a 100X (c y e), f), g) y h) corte de tejido vegetal de hoja de aguacate atacada por *E.perseae* con presencia de conidióforos y conidios visto a 100 X (Jenkins, 1934).

Por último, se consideró la característica de la liberación de pigmentos en el medio de cultivo, ya que, se observó que las cepas con más de dos meses de desarrollo comenzaron a liberar pigmentos naranjas a rojos al medio de cultivo, lo que concuerda con lo descrito por Weiss *et al.* (1987), quienes reportan que el género *Elsinoe* produce pigmentos fotosensibilizadores a los que nombraron elsinocromos (Figura 17).

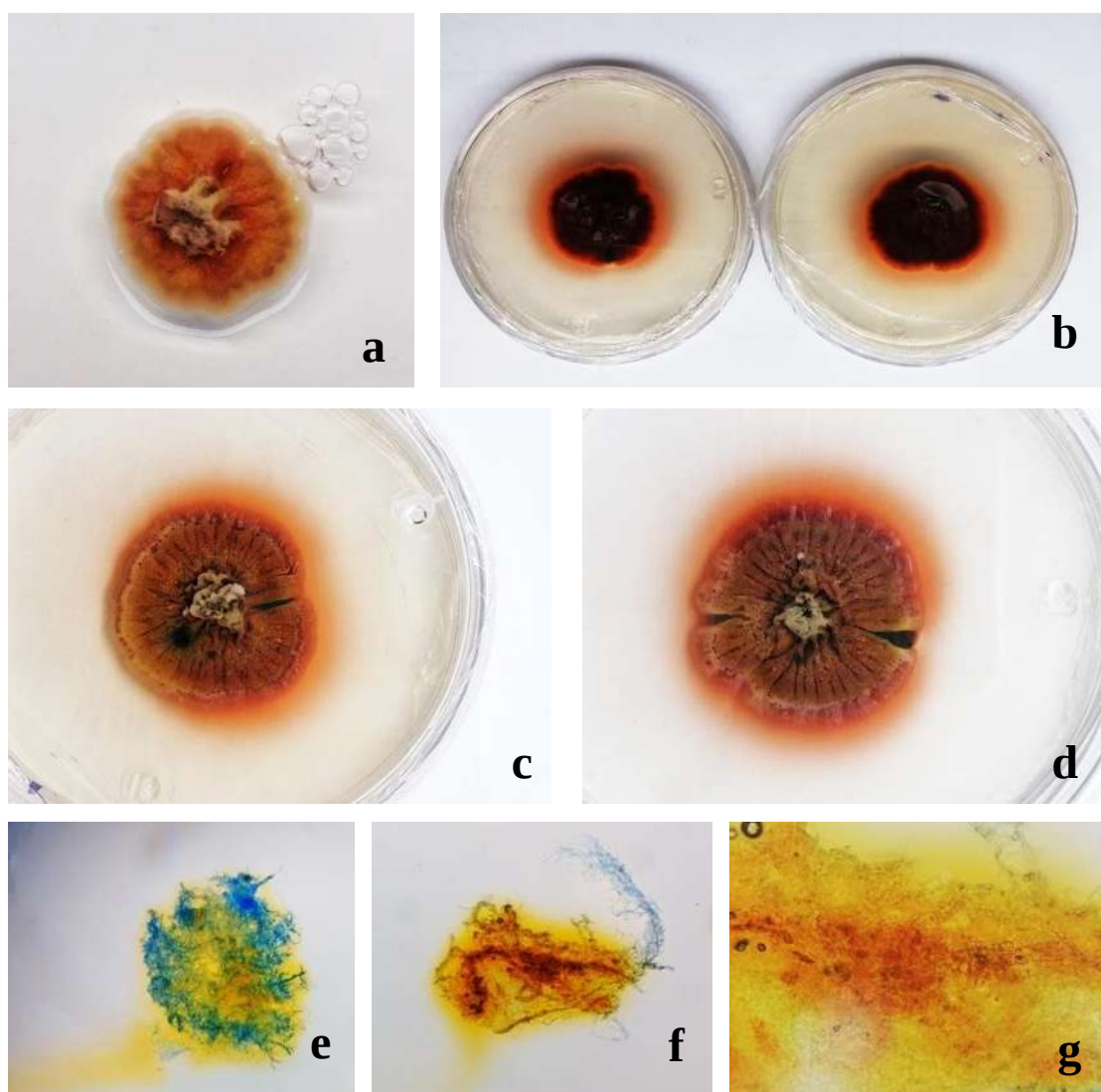


Figura 17. Liberación de elsinocromos en el medio de cultivo, a) cepa identificada morfológicamente como *E. perseae* de dos semanas de crecimiento, b) vista inferior de cajas Petri, con colonias de tres meses de crecimiento, c) y d) vista superior de las cepas, donde se observa el halo rojo de los pigmentos liberados, e) - g) montajes de cepas identificadas como *E. perseae*, liberando elsinocromos en el medio (lactofenol).

Los elsinocromos se han reportado en diversas especies fitopatógenas del género *Elsinoe* como en *E. manihoticola* (Rademacher *et al.*, 1982), *E. tectifiae* (Cheewangkoon *et al.*, 2009), *E. fawcettii* (Hui-Ling y Kuang-Ren, 2018), entre otras especies, lo que refuerza la importancia de esta característica en la identificación de cepas de *E. perseae*.

6.2. Identificación molecular

Se obtuvo ADN genómico de las cepas aisladas de los frutos de aguacate con síntoma de “roña típica” y “mancha púrpura”. En las cepas aisladas de “roña típica” se obtuvo una secuencia de fragmentos de amplificación con los primers ITS5/ITS4, mientras que, las cepas aisladas de “mancha púrpura” se amplificaron y secuenciaron las amplificaciones del ADN utilizando tres pares de primers (ITS-5/ITS-4 o ITS-1/ITS-4, Ef-1 α F/ Ef-1 α R y Sph1F/Sph1R), de los cuales se obtuvieron cinco secuencias de calidad para cada juego de primers (Figura 18).

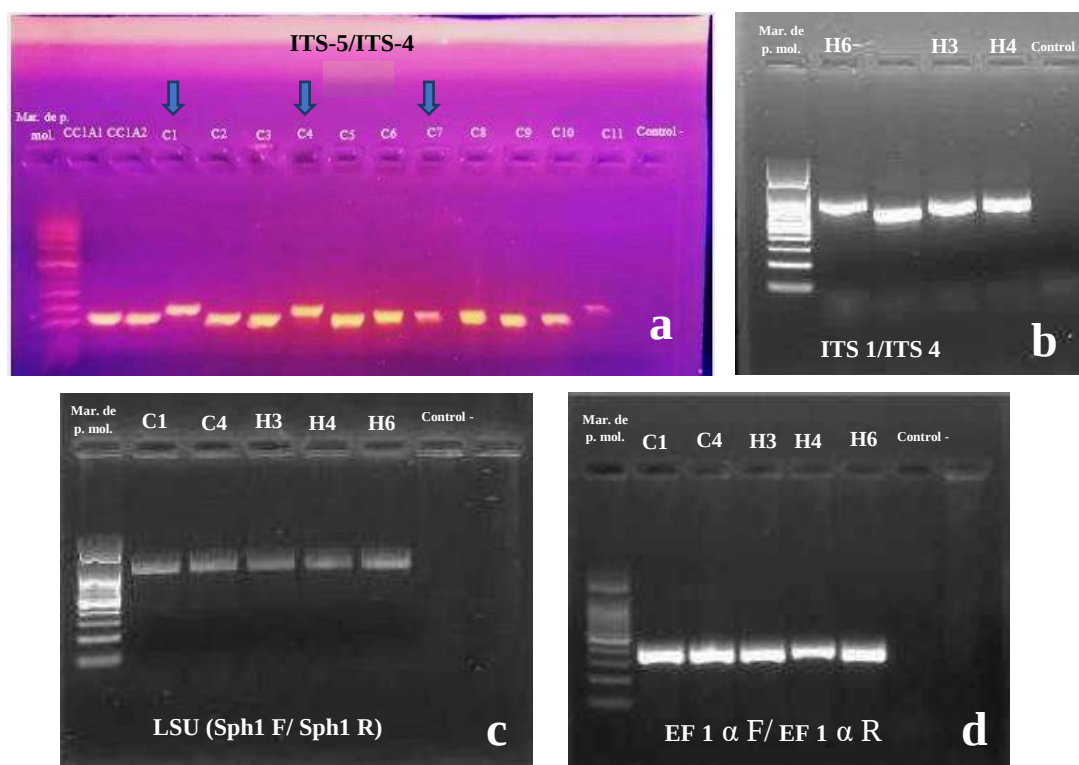


Figura 18. Amplificación por PCR de las cepas aisladas de los síntomas de “roña típica” y “mancha púrpura”, a) amplificación con ITS5/ITS4, para las cepas C1, C4 y C7, b) amplificación con los Primer ITS1/IT4 para la cepa H6, H3 y H4, c) amplificación con Sph1F/Sph1R, para las cepas identificadas como *E. perseae* (C1, C4, H3, H4, H6), d) amplificación con EF-1 α F/ EF-1 α R, para las cepas identificadas como *E. perseae* (C1, C4, H3, H4, H6).

Para el análisis y alineamiento de las secuencias, se utilizó el programa MAFFT v.7.475 (Kato y Standley, 2013) y posteriormente, se compararon con la base de secuencias depositadas en el GeneBank, con el uso de la herramienta BLASTn del NCBI para la identificación preliminar de los hongos a nivel de especie (Cuadro 5 y 6).

Para la identificación con BLASTn se tomó en cuenta el porcentaje de cobertura y de similitud, se consideraron valores $\geq 80\%$ de cobertura y un rango de 97–100% de similitud de la secuencia, es decir, hasta un 3% de divergencia de la secuencia para asignar una especie (Raja y Oberlies, 2017). Los resultados obtenidos de la identificación mediante este análisis concordó con la identificación morfológica en todas las cepas obtenidas.

Cuadro 5. Identificación molecular de las cepas aisladas del síntoma de “roña típica” mediante la amplificación de los primers ITS5/ITS4.

Cepa	Identificación morfológica	Secuencia homóloga del GenBank	Especie	Identidad (%)
C7	<i>Colletotrichum</i> sp.	MK758005.1	<i>C. gloeosporioides</i>	100%
C9	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	N/A	N/A	N/A

Cuadro 6. Identificación molecular del hongo aislado del síntoma de “mancha púrpura” mediante la secuencia de los genes LSU, EF-1 α e ITS.

Cepa	Identificación morfológica	Secuencia homóloga del GenBank	Especie	Identidad (%)
ITS				
C1	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	N/A	N/A
C4	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	<i>E. perseae</i>	99.69 %
H3	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	<i>E. perseae</i>	99.67 %
H4	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	<i>E. perseae</i>	99.51 %
H6	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	<i>E. perseae</i>	97.46 %

Continuación cuadro 6.

Cepa	Identificación morfológica	Secuencia homóloga del GenBank	Especie	Identidad (%)
EF-1 α				
C1	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	100 %
C4	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	99.71 %
H3	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	100 %
H4	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	100 %
H6	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	100 %
LSU				
C1	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.72 %
C4	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.86 %
H3	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.17 %
H4	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.72 %
H6	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.86 %

6.2.1 Análisis filogenético de las cepas aisladas de “roña típica”

Para el análisis filogenético de las cepas identificadas como *C. gloeosporioides*, se utilizó la secuencia obtenida con los primers ITS5/ITS4, así como secuencias ya depositadas en el GenBank de especies homólogas y otras pertenecientes al mismo género (Cuadro 7).

Cuadro 7. Secuencias seleccionadas del GenBank para el análisis filogenético de *C. gloeosporioides*.

Especie	Código de la cepa	Hospedante	País	Número de accesoión en el GenBank
<i>C. gloeosporioides</i>	C7	<i>Persea americana</i>	México	MZ314618
<i>C. gloeosporioides</i>	IMI (T)	<i>Citrus sinensis</i>	Italia	NR_160754.1
<i>C. gloeosporioides</i>	UCR1301	<i>P. americana</i>	California	JX869041.1
<i>C. gloeosporioides</i>	OC	<i>P. americana</i>	México	KP238317.1
<i>C. gloeosporioides</i>	23-703	<i>P. americana</i>	Australia	AY177329.1
<i>C. gloeosporioides</i>	CG	<i>P. americana</i>	Israel	AY177326.1

Continuación cuadro 7.

Especie	Código de la cepa	Hospedante	País	Número de accesión en el GenBank
<i>C. gloeosporioides</i>	Cgg4	<i>P. americana</i>	México	HM562713
<i>C. gloeosporioides</i>	Cgg1	<i>Carica papaya</i>	México	HM562710
<i>C. gloeosporioides</i>	Cgg3	<i>Mangifera indica</i>	México	HM562712
<i>C. asianum</i>	MnM1	<i>M. indica</i>	Colombia	KM233236
<i>C. asianum</i>	MnM2	<i>M. indica</i>	Colombia	KM233237
<i>C. asianum</i>	MnM3	<i>M. indica</i>	Colombia	KM233238
<i>C. fruticola</i>	AM1	<i>P. americana</i>	Colombia	KM233229
<i>C. fruticola</i>	AM2	<i>P. americana</i>	Colombia	KM233230
<i>C. musae</i>	BM1	<i>Musa</i> sp.	Colombia	KM233231
<i>C. musae</i>	BM2	<i>Musa</i> sp.	Colombia	KM233232
<i>C. musae</i>	BM3	<i>Musa</i> sp.	Colombia	KM233233
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010264
<i>C. fruticola</i>	CPO 27.03	<i>P. americana</i>	México	KX278719
<i>C. boninense</i>	126	<i>Grevillea robusta</i>	Kenia	FJ904824.1

Para el análisis filogenético y alineamiento de las secuencias del género *Colletotrichum* se utilizó el programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) con un modelo evolutivo Jukes Cantor (JC) obtenido en el programa JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). Se consideraron 10,000 generaciones y se tomaron muestras de árboles cada 1,000 repeticiones. Se ejecutó bajo el modelo MCMC y el análisis se detuvo una vez que se obtuvo un promedio, de desviación estándar (sd) de partición de frecuencias entre cadenas, menor a 0.01 (sd = 0.0099). Se obtuvieron 22 árboles filogenéticos de los cuales se muestrearon 18, se descartó el 25% de los árboles. El resto de árboles filogenéticos fueron combinados para calcular la probabilidad posterior y obtener un árbol consenso (Holder y Lewis, 2003) (Figura 19).

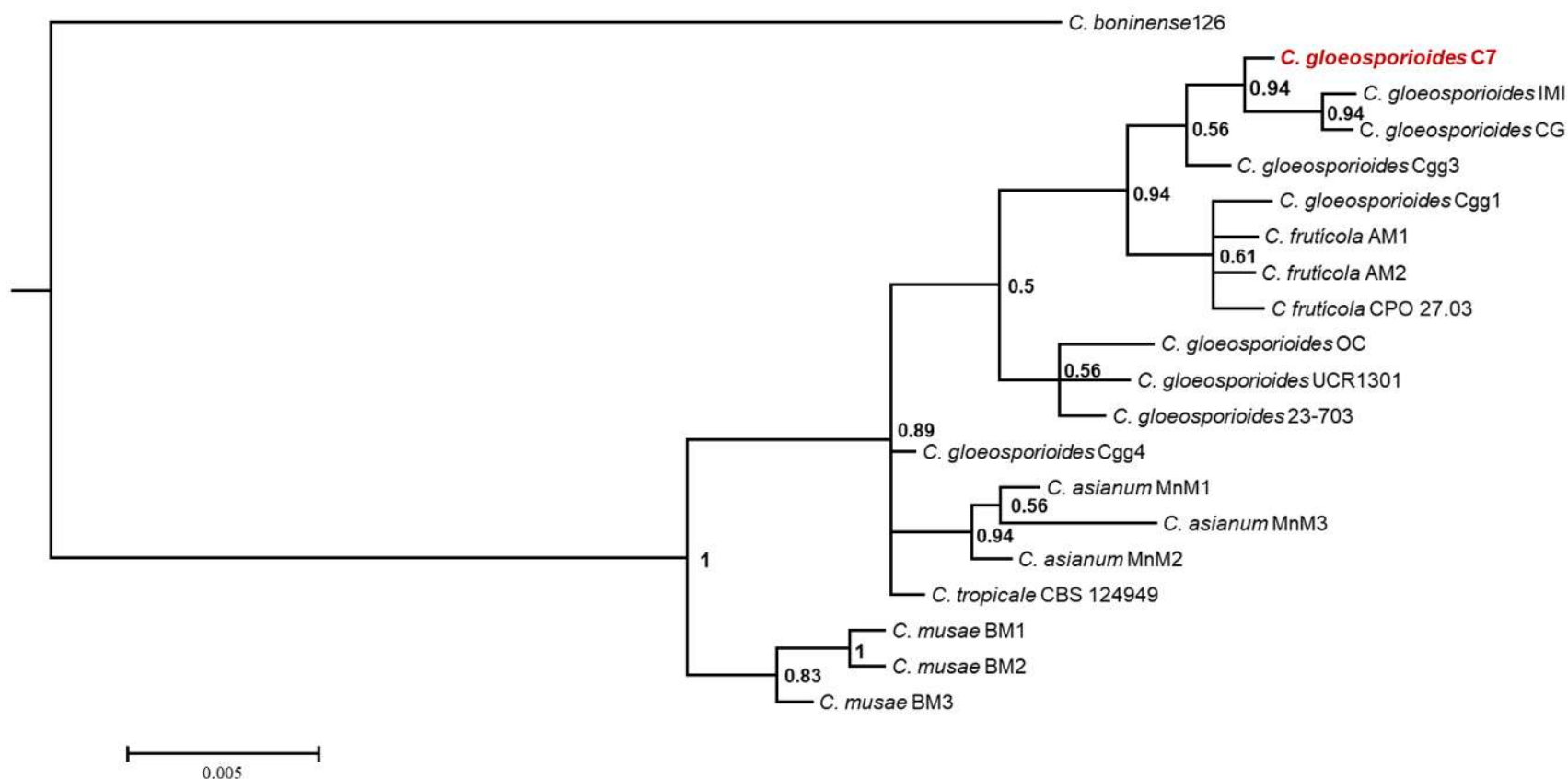


Figura 19. Árbol filogenético Bayesiano para el complejo *Colletotrichum gloeosporioides*, reconstruido utilizando los primers ITS5/ITS4. En rojo se muestra la cepa aislada en este trabajo. La barra indica la sustitución por sitio. En los nodos se ejemplifica la probabilidad posterior (PP). Se utilizó como grupo externo *C. boninense* cepa 126, perteneciente a otro complejo del género.

El árbol filogenético agrupó seis clados diferentes, además del grupo externo, de los cuales dos agrupan en su totalidad a la especie *C. gloeosporioides*, donde se encuentra la cepa obtenida de frutos de aguacate con el síntoma de “roña típica”. Esto corrobora la identidad de las cepas aisladas en este trabajo como *C. gloeosporioides*.

Las cepas identificadas morfológicamente como *Pestalotiopsis* sp., se amplificaron con los primers ITS4/ITS5, sin embargo, los resultados de la secuenciación no fueron concluyentes, por tal motivo no fue posible realizar el análisis filogenético de este género.

6.2.2. Análisis filogenético de las cepas aisladas del síntoma de “mancha púrpura”

Dada la importancia científica de las cepas aisladas del síntoma de “mancha púrpura” e identificadas como *E. perseae*, se seleccionó este hongo para realizar un análisis filogenético multilocus, con la finalidad de aportar mayor confiabilidad y soporte a la identificación de las cepas. Para realizar el análisis, se consideraron las secuencias obtenidas en esta investigación, las secuencias homólogas, así como de otras especies del mismo género que ocasionan daños similares en otras especies de plantas. Además de la secuencia de *Myriangium hispanicum* que pertenece a una familia diferente para usarla como grupo externo. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del GenBank, de acuerdo con lo reportado por Fan *et al.* (2017) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Secuencias seleccionadas para el análisis filogenético de *E. perseae*

ESPECIE	CÓDIGO DE LA CEPA	HOSPEDANTE	PAÍS	NÚMERO DE ACCESIÓN EN EL GENBANK		
				ITS	LSU	EF-1 α
<i>E. perseae</i>	C1	<i>P. americana</i>	México	N/A	MZ310447	MZ319391
<i>E. perseae</i>	C4	<i>P. americana</i>	México	MZ310437	MZ310448	MZ319392
<i>E. perseae</i>	H3	<i>P. americana</i>	México	MZ310438	MZ310449	MZ319393
<i>E. perseae</i>	H4	<i>P. americana</i>	México	MZ310439	MZ310450	MZ319394
<i>E. perseae</i>	H6	<i>P. americana</i>	México	MZ310440	MZ310451	MZ319395
<i>E. perseae</i> (tipo)	CBS 406.34(T)	<i>P. americana</i>	EUA	NR_148160.1 KX887258	KX887021	KX886903
<i>E. perseae</i>	CBS 288.64	<i>P. americana</i>	Brasil	KX887257	KX887020	KX886902
<i>E. ampelina</i>	CBS 208.25	<i>Vitis vinifera</i>	Brasil	KX887186	KX886950	KX886832
<i>E. anacardii</i>	CBS 211.63	<i>Annona squamosa</i>	India	KX887187	KX886951	KX886833
<i>E. annonae</i>	CBS 228.64	<i>Annona</i> sp.	USA	KX887190	KX886954	KX886836
<i>E. australis</i>	CBS 229.64	<i>Citrus aurantiifolia</i>	Brasil	KX887196	KX886960	KX886842
<i>E. bidentis</i>	CBS 512.50 (T)	<i>Bidens pilosa</i>	Brasil	KX887201	KX886965	KX886847
<i>E. bidentis</i>	CPC 18526 = RWB 1127	<i>B. segetum</i>	Brasil	KX887202	KX886966	KX886848
<i>E. limonia</i>	CPC 18535T = RWB 1175	<i>C. limonia</i>	Brasil	KX887207	KX886970	KX886853

Continuación cuadro 8.

ESPECIE	CÓDIGO DE LA CEPA	HOSPEDANTE	PAÍS	NÚMERO DE ACCESIÓN EN EL		
				GENBANK		
				ITS	LSU	EF-1 α
<i>E. embeliae</i>	CBS 472.62 (T)	<i>Embelia ribes</i>	India	KX887211	KX886974	KX886857
<i>E. eucalypticola</i>	CBS 124765T = CPC 13318	<i>Eucalyptus</i> sp.	Australia	KX887215	KX886978	KX886861
<i>E. euphorbiae</i>	CBS 401.63 (T)	<i>Euphorbia parviflora</i>	India	KX887217	KX886980	KX886863
<i>E. fawcettii</i>	CBS 139.25 (T)	<i>Citrus</i> sp.	USA	KX887219	KX886982	KX886865
<i>E. fawcettii</i>	CBS 231.64	<i>C. aurantiifolia</i>	USA	KX887220	KX886983	KX886866
<i>E. genipae</i>	CBS 342.39 (T)	<i>Genipa americana</i>	Brasil	KX887227	KX886990	KX886873
<i>E. glycines</i>	CBS 389.64 (T)	<i>Glycine soja</i>	Japón	KX887229	KX886992	KX886875
<i>E. glycines</i>	CBS 390.64	<i>G. soja</i>	Japón	KX887230	KX886993	KX886876
<i>E. mangiferae</i>	CBS 226.50 (T)	<i>M. foetida</i> (syn. <i>M. indica</i>)	Cuba	KX887249	KX887012	KX886894
<i>E. mattirolaanum</i>	CBS 287.64	<i>Arbutus unedo</i>	Argentina	KX887250	KX887013	KX886895
<i>E. menthae</i>	CBS 322.37 (T)	<i>M. piperita</i>	EUA	KX887253	KX887016	KX886898

Continuación cuadro 8.

ESPECIE	CÓDIGO DE LA CEPA	HOSPEDANTE	PAÍS	NÚMERO DE ACCESIÓN EN EL GENBANK		
				ITS	LSU	EF-1 α
<i>E. oleae</i>	CBS 227.59 (T)	<i>Olea europaea</i>	Italia	KX887256	KX887019	KX886901
<i>E. phaseoli</i>	CBS 149.95	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Sudáfrica	KX887259	KX887022	KX886904
<i>E. phaseoli</i>	CBS 151.95	<i>P. vulgaris</i>	Malawi	KX887261	KX887024	KX886906
<i>E. phaseoli</i>	CBS 165.31 (T)	<i>P. lunatus</i>	Cuba	KX887263	KX887026	KX886908
<i>E. phaseoli</i>	CBS 234.64	<i>P. lunatus</i>	Cuba	KX887264	KX887027	KX886909
<i>E. piri</i>	CBS 179.82	<i>Malus sylvestris</i>	Nueva Zelanda	KX887268	KX887031	KX886913
<i>E. pitangae</i>	CBS 227.50 (T)	<i>Eugenia pitanga</i>	Brasil	KX887269	KX887032	KX886914
<i>E. poinsettiae</i>	CBS 109333	<i>E. pulcherrima</i>	Guatemala	KX887270	KX887033	KX886915
<i>E. poinsettiae</i>	CBS 109334	<i>E. pulcherrima</i>	Guatemala	KX887271	KX887034	KX886916
<i>E. punicae</i>	CPC 19968	<i>Punica granatum</i>	Sudáfrica	KX887276	KX887039	KX886921
<i>E. randii</i>	CBS 170.38 (T)	<i>Carya</i> sp.	Brasil	KX887278	KX887041	KX886923
<i>E. rosarum</i>	CBS 212.33 (T)	<i>Rosa</i> sp.	EUA	KX887283	KX887046	KX886928
<i>E. rosarum</i>	CBS 213.33	<i>Rosa</i> sp.	EUA	KX887284	KX887047	KX886929

Continuación cuadro 8.

ESPECIE	CÓDIGO DE LA CEPA	HOSPEDANTE	PAÍS	NÚMERO DE ACCESIÓN EN EL GENBANK		
				ITS	LSU	EF-1 α
<i>E. sicula</i>	CBS 398.59 (T)	<i>Prunus amygdalus</i>	Italia	KX887289	KX887052	KX886934
<i>E. terminaliae</i>	CPC 18538	<i>T. catapa</i>	Brasil	KX887294	KX887057	KX886938
<i>E. veneta</i> E	CBS 164.29T = ATCC 1833	<i>Rubus</i> sp.	N/A	KX887297	KX887060	KX886941
<i>E. violae</i>	CBS 336.35 (T)	<i>Viola</i> sp.	USA	KX887302	KX887065	KX886946
<i>Myriangium hispanicum</i> (outgroup)	CBS 247.33	<i>Acer monspessulanum</i>	N/A	KX887304	KX887067	KX886948

Una vez obtenidas las secuencias, se creó un archivo en formato fasta. Las secuencias se alinearon con el programa MAFFT v.7.475 (Katoh y Standley, 2013) para cada gen. La concatenación de los genes se realizó con el programa Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) y MESQUITE v.3.6 (Maddison y Maddison, 2016). El modelo evolutivo se obtuvo con el software JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). En análisis filogenético se realizó mediante el algoritmo de Inferencia Bayesiana con el programa MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012). Se consideraron 575,000 generaciones y se tomaron muestras de árboles cada 1,000 repeticiones. Se ejecutó bajo el modelo MCMC y el análisis se detuvo una vez que se obtuvo un promedio, de desviación estándar de partición de frecuencias entre cadenas, menor a 0.01 (sd = 0.0097). Se obtuvieron 1,152 árboles filogenéticos de los cuales se muestrearon 864, se descartó el 25% de los árboles muestreado. El resto de árboles fueron combinados para calcular la probabilidad posterior y obtener un árbol consenso (Holder y Lewis, 2003) (Figura 20).

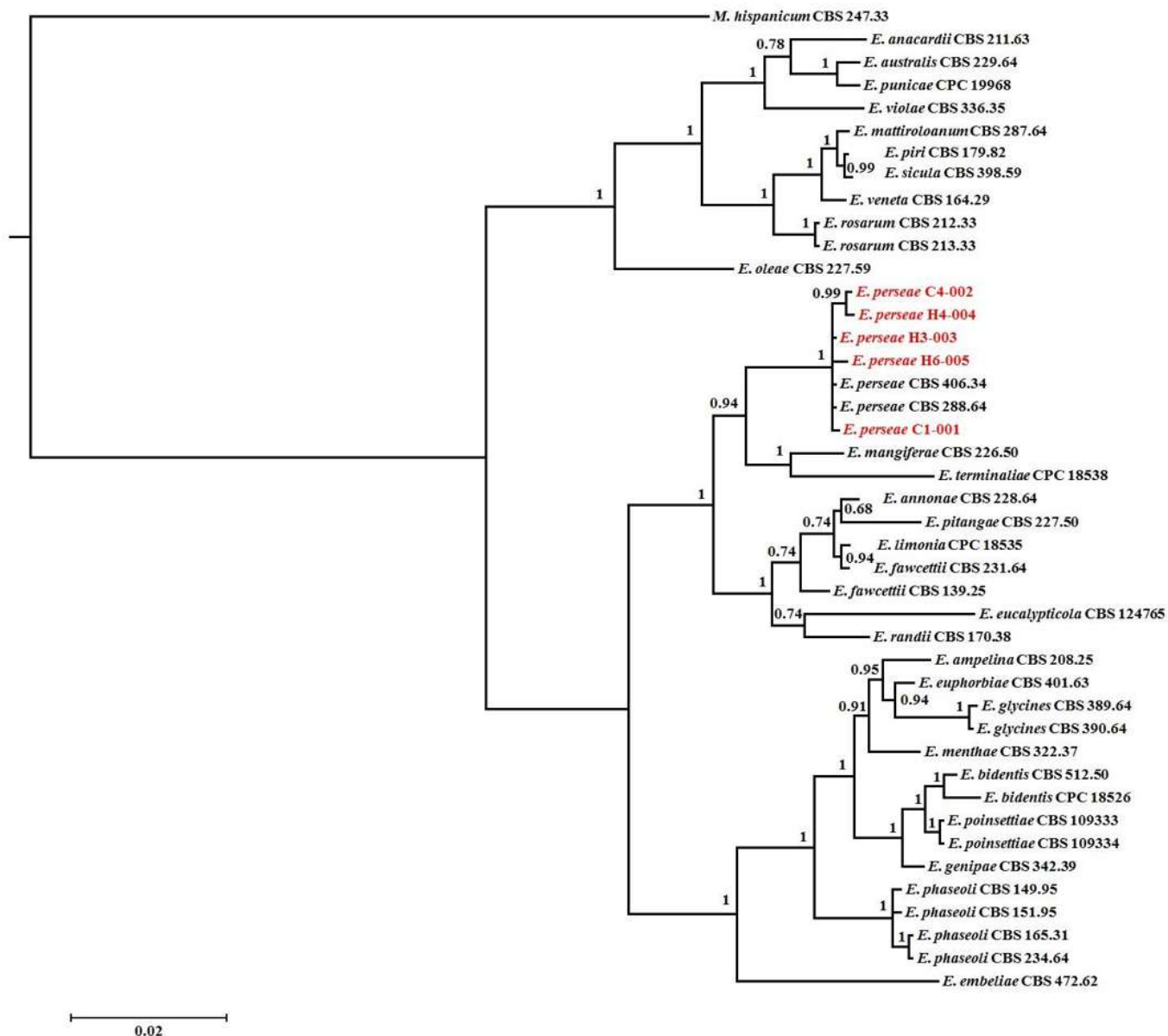


Figura 20. Árbol filogenético Bayesiano para las especies del género *Elsinoe*, reconstruido utilizando secuencias concatenadas de los primers ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, EF-1 α F/EF-1 α R, Sph1 F/Sph1 R. En rojo se encuentran las cepas aisladas en este trabajo. La barra indica la sustitución por sitio. En los nodos se ejemplifica la probabilidad posterior (PP). Se utilizó como grupo externo la especie *Myriangium hispanicum* cepa CBS 227.59, perteneciente a otra familia del mismo orden.

El árbol filogenético Bayesiano agrupó más de 14 clados diferentes, además del grupo externo. Las secuencias obtenidas de las cepas identificadas morfológicamente como *E. perseae* se agruparon con las cepas depositadas en el Gen Bank con la misma especie, lo que corrobora la identidad de las cepas aisladas del síntoma de “mancha púrpura” como *E. perseae* y soporta el origen monofilético de esta especie.

6.3. Pruebas de patogenicidad

Las cepas seleccionadas para las pruebas de patogenicidad fueron las que tuvieron un porcentaje mayor de crecimiento en cada síntoma muestreado. Se evaluó el tipo de síntoma ocasionado y la incidencia del hongo en las plantas de aguacate de la variedad Hass, Flor de María y criollas inoculadas con cuatro cepas diferentes. Se inoculó con *Pestalotiopsis* sp. y *C. gloeosporioides* para evaluar el síntoma de “roña típica”; además, se evaluó y la cepa identificada como *E. perseae* aislada del síntoma de “mancha púrpura”, así como la cepa de referencia ATCC 11190 (identificada como *Sphaceloma perseae* = *E. perseae*).

6.3.1 *Pestalotiopsis* sp.

El síntoma que ocasionó el hongo identificado como *Pestalotiopsis* sp., fue necrosis seca que avanzó por el tallo hasta la base de la rama y provocó la momificación de los frutos en plantas de las variedades Hass y Flor de María. Los síntomas menos severos se encontraron en las plantas criollas y la variedad Flor de María, ocasionando una necrosis parcial con grietas verticales, estos síntomas concuerdan con lo reportado por Tamayo-Molano (2007), como secamiento de ramas y mancha foliar (Figura 21).

Otros autores como Morales-García *et al.* (2009), han aislado a *Pestalotiopsis versicolor* de frutos con síntomas de antracnosis, y a *Pestalotiopsis* sp. de frutos de aguacate con síntomas de roña. Sin embargo, a pesar de que la cepa de *Pestalotiopsis* sp. inoculada reprodujo una corchosis, no se replicó el síntoma típico de roña observado en campo, por lo que se descarta a *Pestalotiopsis* sp. como el agente causal de la roña típica.



Figura 21. Evaluación de la patogenicidad de *Pestalotiopsis* sp. sobre frutos y tallos de plantas de aguacate criollo y de las variedades Hass y Flor de María, a)-c) necrosis total de los tallos inoculados, Variedades Hass y Flor de María d) tallos con severidad moderada, e) síntomas de necrosis con grietas costrosas en plantas criollas, f) momificación del fruto por necrosis total en la variedad Flor de María.

Se han reportado especies de *Pestalotiopsis* como patógenos de algunas variedades de aguacate y otros frutales como mango, manzana, plátano y uva. Sin embargo, se desconocía con exactitud los daños que puede causar este hongo en el fruto de aguacate (Zhang *et al.*, 2003; Djeugap *et al.*, 2015). En las pruebas de patogenicidad, realizadas en este trabajo, se comprobó que *Pestalotiopsis* sp. puede ocasionar una necrosis seca total del fruto, hasta dejarlo momificado, y en ramas provoca necrosis con agrietamientos corchosos, estos síntomas son diferentes a los reportados para la roña típica.

6.3.2. *Colletotrichum gloeosporioides*.

Las enfermedades causadas por *C. gloeosporioides* incluyen la antracnosis, podredumbre de frutos y flores, la mancha foliar, entre otros tipos de pudriciones, afecta a una amplia gama de cultivos, entre los que destaca el aguacate (Freeman *et al.*, 1998; Silva y Ávila, 2011). Al ser un hongo de rápido crecimiento, puede entrar como patógeno secundario al aprovechar las lesiones que provocan otros hongos como *E. perseae* Stevens (1922), Burnett, (1974) y Zentmyer (1984) describieron que *C. gloeosporioides* es incapaz de entrar en la fruta ilesa y generalmente se establece en las lesiones en el fruto causadas por *Cercospora* sp. o por *E. perseae*., por lo que, es posible que *C. gloeosporioides* se encuentre como un patógeno oportunista.

Las pruebas de patogenicidad para la cepa identificada como *Colletotrichum gloeosporioides* reprodujeron síntomas similares a la roña, lo que comprueba que otros patógenos pueden estimular la producción de capas de corcho como lo describe Cruz-Borrueal *et al.* (2006). Las plantas inoculadas con la cepa identificada como *C. gloeosporioides* presentaron en el fruto, un síntoma inicial de manchas necróticas que al crecer formaron grietas de aspecto corchoso, similares a las descritas por Jenkins (1934), Everett *et al.* (2011) y Fan *et al.* (2017) ocasionadas por *E. perseae*. En tallos se observaron síntomas de necrosis con grietas longitudinales, similares a los reproducidos por *Pestalotiopsis* sp.; mientras que, en ramas tiernas y pedúnculo, el síntoma fue similar a lo descrito por Jenkins (1934) como roña del aguacate (Figura 22).

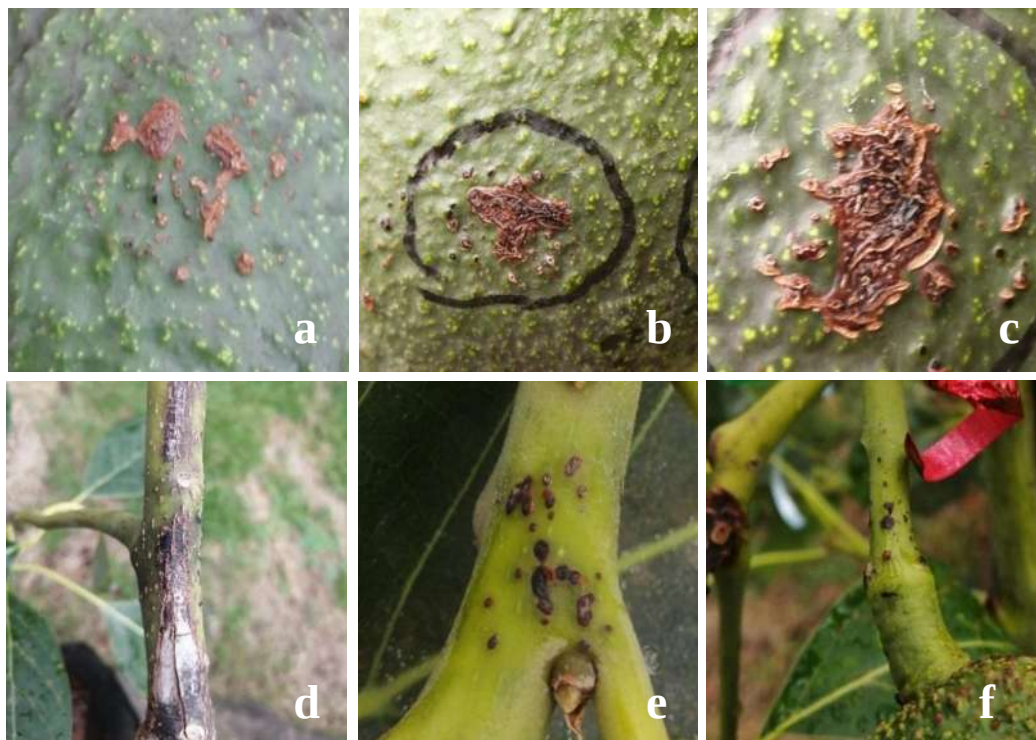


Figura 22. Prueba de patogenicidad de *C. gloeosporioides*. a) síntoma inicial en frutos de aguacate variedad Hass, b) expresión del síntoma a los tres meses de la inoculación, c) síntoma de agrietamiento, d) necrosis de ramas, e) y f) ramas jóvenes y pedúnculo con machas necróticas que al unirse forman una costra, similar a lo reportado para *E. perseae*.

6.3.3. Cepa de referencia ATCC 11190 (teleomorfo *E. perseae* = anamorfo *S. perseae*)

Se evaluó la patogenicidad de la cepa de referencia ATCC 11190 de *E. perseae* con el propósito de comparar los síntomas. Se encontró severidad mayor en las platas de aguacate criollo, presentaron machas circulares elevadas que al crecer y unirse formó una costra. El síntoma también se expresó en frutos, tallos y nervaduras de la hoja; mientras que, en la variedad Hass, el síntoma solo se desarrolló en frutos, pero con un crecimiento lento, esto concuerda con lo descrito por Jenkins (1934) (Figura 23).

En plantas criollas de aguacate se observó deformación de las hojas, daño en nervaduras y en pecíolos, así como una apariencia de corchosis alrededor del daño, lo que concuerda con lo reportado por Jenkins (1934). Además, se presentaron perforaciones en el folíolo, como lo descrito por Pernezny y Marlatt (2007) (Figura 24).



Figura 23. Patogenicidad de la cepa ATCC11190 de (*Elsinoe perseae* = *Sphaceloma perseae*) a) síntoma inicial en tallos de plantas de aguacate criollo, b) síntoma avanzado en tallos de plantas criollas, c) desarrollo del hongo en pecíolo y nervadura de las hojas, d) desarrollo del síntoma en fruto criollo, e) lesiones pequeñas con agrietamiento en frutos de plantas criollas, f) síntoma inicial en frutos de la variedad Hass.

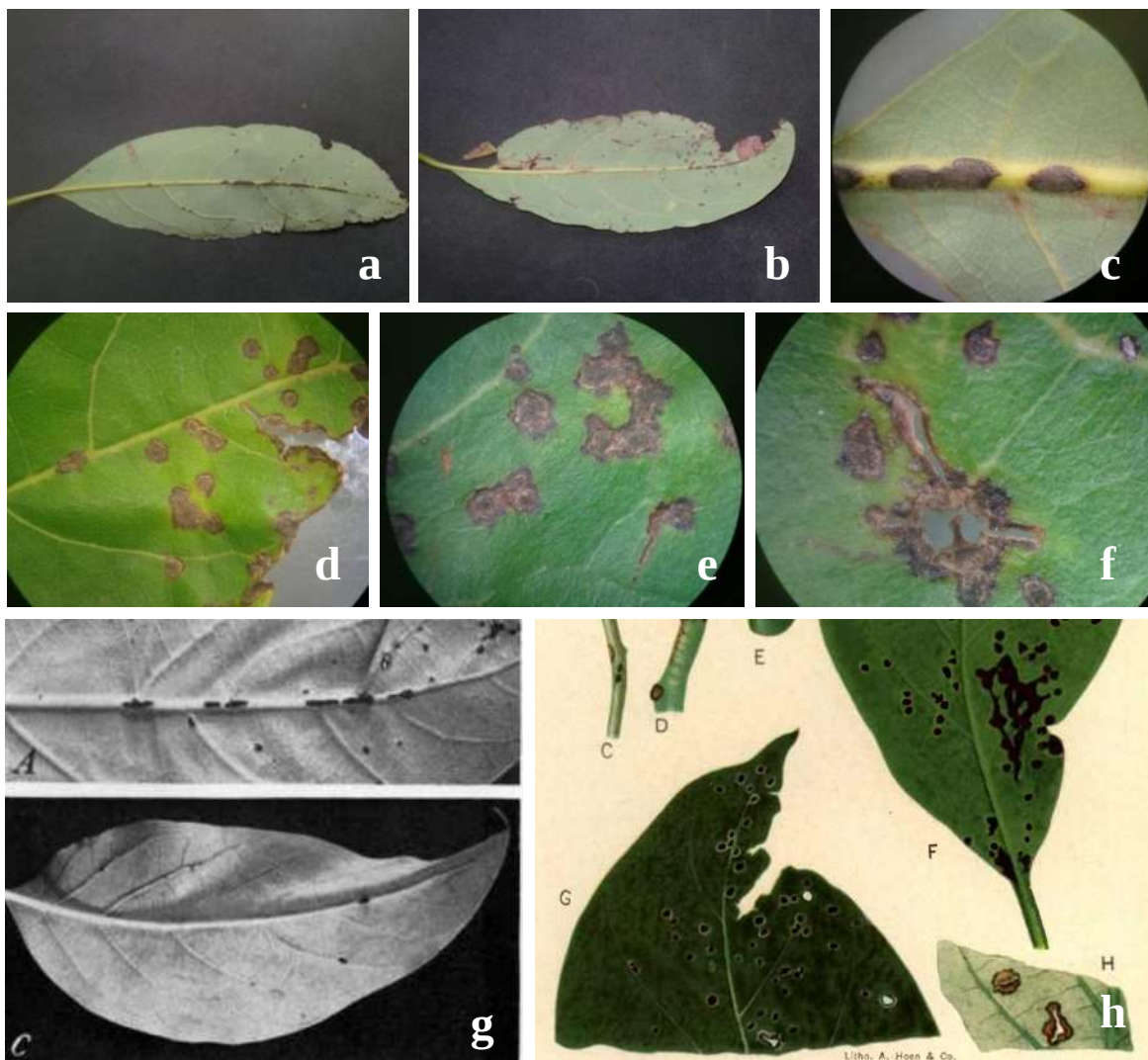


Figura 24. Prueba de patogenicidad de la cepa ATCC 11190 (*E. perseae* = *S. perseae*) en hojas de plantas de aguacate criollo, a) y b) deformación de hojas por ataque a la nervadura central, c) vista al microscopio estereoscópico del daño en nervadura central y parte del pecíolo, d) y e) lesiones en la lámina foliar, f) perforación de la lámina foliar por daño avanzado de roña, g) y h) síntoma de roña en hojas de aguacate según Jenkins (1934).

6.3.4. *Elsinoe perseae*

La cepa identificada morfológicamente como *E. perseae*, fue aislada de frutos con el síntoma de “mancha púrpura”. Esta cepa se inoculó en plantas de aguacate criollo y en plantas de la variedad Flor de María. Se reprodujeron los síntomas iniciales, que son encontrados en campo, semejante a los reportados por Morales-García (2017) y a su vez a las lesiones iniciales coinciden con lo reportado por Jenkins (1934), Everett *et al.* (2011) y Fan *et al.*

(2017) como roña del aguacate. Se observaron lesiones circulares pequeñas o con borde irregular, de color oscuro a violáceos. Se evaluó durante dos meses, al final de la evaluación las lesiones alcanzaron un tamaño máximo de 8 mm (Figura 25). Se realizó un reaislamiento de los síntomas producidos en los frutos y se obtuvieron cepas que coincidieron morfológicamente con las cepas inoculadas. Además, la identidad de las cepas se corroboró mediante la identificación molecular, tanto de la cepa inoculada como de la cepa reislada de las pruebas de patogenicidad. En ambos casos, se confirmó que se trata del hongo *E. perseae*, que se asocia como agente causal de la “mancha púrpura” (Morales-García, 2017) o “roña del aguacate” (Jenkins, 1934).



Figura 25. Síntomas iniciales en las pruebas de patogenicidad con la evaluación de *E. perseae*, a) síntomas iniciales en el fruto 1 de la variedad Flor de María, b) síntomas en el fruto 1, dos meses después de la aparición del síntoma inicial, c) síntomas iniciales en fruto 2, d) síntomas en el fruto 2 de la variedad Flor de María dos meses después de la aparición del síntoma inicial.

La caracterización del síntoma de “mancha púrpura” descrito por Morales-García (2017), coincide con la descripción de la roña del aguacate realizada por Jenkins (1934), Everett *et al.* (2011) y Fan *et al.* (2017), esto demuestra que estos nombres comunes son sinónimos y están asociados al mismo agente causal. En este trabajo se logró el aislamiento del patógeno causante del síntoma de la “mancha púrpura”, se utilizó un protocolo diferente y reproducible a los utilizados en la mayoría de los aislamientos en otros hongos fitopatógenos (Correa-Suárez, 2019). Esto se debe al lento crecimiento de *E. perseae*, ya que diversos autores (Burnet, 1974; Stevens, 1922 y Zentmyer, 1984), mencionan que el género *Colletotrichum* puede ser un hongo invasor secundario en daños provocados por otros patógenos, esto puede explicar por qué en otras investigaciones no se asocia a *E. perseae* con el síntoma de roña del aguacate como en el caso de Everett *et al.* (2007) y Alfaro- Espino (2017).

Otra situación, es la identificación errónea del síntoma de roña en campo, ya que en los muestreos de este trabajo se comprobó que otros patógenos, plagas y daños mecánicos pueden provocar corchosis en el pericarpio del fruto como mecanismos de defensa (Cruz-Borrueal, 2006). Por lo que, la caracterización e identificación del síntoma es de suma importancia para realizar un manejo integrado adecuado.

7. CONCLUSIONES

El síntoma de roña en frutos de aguacate es producido por factores bióticos y abióticos como un estímulo de la planta a las lesiones. Los síntomas de roña, causados por hongos patógenos, más comunes en campo son la “roña típica” y la “mancha púrpura”.

El síntoma de “roña típica” no se reprodujo en las pruebas de patogenicidad con los hongos aislados; aunque, *C. gloeosporioides* produjo síntomas similares pero no iguales, mientras que, *Pestalotiopsis* sp. reprodujo una muerte descendente y momificación de los frutos.

El síntoma de “mancha púrpura” se reprodujo con éxito con la cepa identificada morfológica y molecularmente como *E. perseae*, asociando a este hongo como el agente causal de la “mancha púrpura”.

8. LITERATURA CITADA:

Agrios G .N. (2005). Fitopatología, 2da edición. México, Limusa, p 952.

Alfaro-Espino E., Morales-García J.L., Pedraza-Santos M.E., Chávez-Bárcenas A.T. y Morales-Montelongo K.L. (2017). Hongos asociados al síndrome de la roña del aguacate en el estado de Michoacán, México. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. 04-07 de septiembre 2017. Ciudad Guzmán, Jalisco, México. Pp. 114-125.

Antonelli E. F. (1980). Respuestas de las plantas a la acción de los organismos fitopatógenos. Rev. Facultad de Agronomía, 1 (1). Pp. 63-72.

Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México (APEAM) (2020a). Informe de mercado (IDM) semana 6. Consultado el 25 de febrero del 2020. Recuperado de:

Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México (APEAM) (2020b). Exportaciones de aguacate de México a Estados Unidos. Consultado el 03 de marzo del 2020. Recuperado de:

Ávila-Quezada G. (2002). Distribución espacio-temporal de la roña, antracnosis y daño por trips en aguacate (*Persea americana*) en Michoacán, México. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. IFIT. Texcoco, México. Pp 77-89.

Ávila-Quezada G., Silva R. H. y Téliz O. D. (2007). First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. Journal Plant Disease, 91(9). Pp. 1200-1213.

Ayala-Escobar V., Santiago-Santiago V. y Nava-Díaz C. (2016). Caracterización of *Elsinoe Pyri* associated whith Apple scab in Texcoc, Mexico. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología. Pp. 42-43.

Bagsic I., Linde M. y Debener T. (2015). Genetic diversity and pathogenicity of *Sphaceloma rosarum* (teleomorph *Elsinoë rosarum*) causing spot anthracnose on roses. *Plant Pathology*, 65(6). Pp. 978–986.

Barnett H. L., y Hunter B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society. Pp. 1-217.

Barr D. J. S. (1992). Evolución of kingdoms of organism from the perspective of a mycologist. *Mycologia*, 84 (1). Pp. 1-11.

Becerra-Morales D. (2019). Síndrome de roña en aguacate Hass y criollos: hongos asociados, cambios fisiológicos, físicos y químicos. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Agroalimentarias. Universidad Autónoma Chapingo. Pp.1-142.

Beltrán P. H. (2008). El viroide de la mancha de sol del aguacate en Michoacán: etiología y distribución local. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Pp. 1-68.

Berbee M.L. y Taylor J.W. (2000). Fungal molecular evolution: gene trees and geological time. In: McLaughlin D, McLaughlin EG, Lemke PA, eds. *The Mycota, a Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research*, 7. Systematics and Evolution. New York, NY, U.S.A.: Springer-Verlag. Pp. 229-245.

Berbee, M.L. (2001). The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59. Pp. 165-187.

Bitancourt A. A. y Jenkins A. E. (1936). Perfect Stage of the Sweet Orange Fruit Scab Fungus. *Mycologia*, 28(5). Pp. 489–492.

Bitancourt A. A. y Jenkins A. E. (1941). Treze novas especies de “*Elsinoe*” do Brasil. *Arquivos do Instituto Biologico de Sao Paulo*, 12. Pp. 1–20.

Boyzo M. J. (2014). Etiología y manejo sustentable de canceres en ramas de la zarzamora (*Rubus* sp.). Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en producción agrícola sustentable, Instituto Politécnico Nacional. Pp. 13-16.

Bruner S. C. (1920). Lista preliminar de las enfermedades de las plantas de importancia económica para Cuba. Cuba Estac. Expt. Agron. Informe 1918-19, 1919-20: p 728.

Burnett H. (1974). Avocado scab. Florida Department of Agriculture and Consumer Services Plant Pathology Circular, 141. Pp. 1-2.

Butler D. K. y Metzenberg R. L. (1989). Premeiotic change of nucleolus organizer size in *Neurospora*. Genetics, 122. Pp. 783–791.

Centro de estudios para el desarrollo rural sustentable y la soberanía alimentaria (CEDRSSA) (2017). reporte caso de exportación: el aguacate. palacio legislativo de San Lazaro. Pp. 1- 24.

Comité Estatal de Sanidad Vegetal Guanajuato (CESAVEG) (2008). Campaña de Manejo Fitosanitario del Aguacatero. Pp. 1-12

Coria A. V. M. (2008). Tecnología para la producción de aguacate en México. Libro Técnico Núm. 8. SAGARPA–INIFAP. 2ª Edición y 1ª. Reimpresión. Uruapan, Michoacán, México. Pp. 1-124.

Correa-Suarez M. (2019). Identificación molecular y caracterización morfológica de *Sphaceloma perseae* en la franja aguacatera de Michoacán. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias biológicas por la Universidad Michoacana “San Nicolas de Hidalgo”. Pp. 1-67.

Cruz-Borrueal M., Hernández F. Y. y Rivas F. E. (2006). Mecanismos de Resistencia de las Plantas al Ataque de Patógenos y Plagas. Temas de Ciencia y Tecnología, 10 (29). Pp. 45-54.

Djeugap F. J., Tsopmbeng N. G., Keuete K. E., Yaouba A. y Serferbe S. (2015). Isolation and identification of fungi associated whit avocado fruits from local markets of the west región of Cameroon. *International Journal of Agriculture and Biosciences*, 4(2). Pp. 64-68.

Esteban-Marina A. U. (2016). NMX-FF-016-2002. Productos alimenticios no industrializados para uso humano - fruta fresca - aguacate (*Persea americana* Mill) – especificaciones (Cancela a la NMX-FF-016-1995-SCFI). *Diario oficial de la federación*. Pp.1-9.

Everett K. R., Rees-George J., Pushparajah I. P. S., Manning M. A. y Fullerton R.A. (2011). Molecular Identification of *Sphaceloma perseae* (Avocado Scab) and its Absence in New Zealand. *Journal of Phytopathology*, 159(2). Pp. 106-113.

Everett K., Fullerton R. A., Manning M. A., Rees-George J. y Hartill W. F. T. (2007). Avocado scab is not present in New Zealand. *Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007*. Viña Del Mar, Chile. 12 – 16 Nov. 2007. Consultado 25 de septiembre del 2019. Recuperado de: <http://www.avocadosource.com/WAC6/es/Extenso/2b-75.pdf>

Fan X.L., Barreto R.W., Groenewald J.Z., Bazerra J.D.P., Preira O.L., Cheewangkoon R., Mostert L., Tian C.M. y Crous P.W. (2017). Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoe* (Myrnygiales Dothideomycetes) Pp.1-20.

FAOSTAT (Food and Agriciulture Organization of the United Nations) (2011). Producción, País por Producto. Consultado el 19 de septiembre del 2019 Recuperado de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

Freeman S., Katan T., y Shabi E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. *Plant Disease*, 82(6). Pp. 596–605.

García J., Morales L. L. J., Mendoza A. R. M., Coria M. M. V., Aguirre P. L. J., Sánchez F. J. L., Vidales V. A. J., Tapia R. M. L., Hernández R. G. y Alcántar J. J. (2013). Tecnología Produce Aguacate en Michoacán. COFUPRO. Pp. 1-32.

Geiser D. M., Jiménez-Gasco M. M., Kang S., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T. J., Zhang N., Kuldau G. y O'Donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. Molecular Diversity and PCR-Detection of Toxigenic *Fusarium* Species and Ochratoxigenic Fungi. Pp. 473–479.

Gilchrist-Saavedra L. I. (2000). Problemas fitosanitarios de los cereales de grano pequeño en los Valles Altos de México. Revista Mexicana de Fitopatología, 18(2):132-137.

González-Hernández H., Johansen-Naime R. M., Gazca-Corona L., Equihua-Martínez A., Salinas-Castro A., Estrada Venegas E.G. y Valle de la Paz A. R. (2000). Plagas de aguacate. In Téliz, D; Mora, G. El aguacate y su manejo integrado. México, Mundi Prensa Libros. México. Pp 121-177.

Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser, 41. Pp. 95–98.

Hartill W. F. T. (1991). Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 19 (3). Pp. 297-304.

Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C. y Pegler D. N. (1995). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th ed. Wallingford, U.K.: CAB International. P 650.

Hodges C. S. (1969). A new species of *Phyllachora* on persea. Mycologia, Vol.61. Pp 838-840.

Holder M.T. y Lewis P. O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. Nature Reviews Genetics, 4(4). Pp. 275-284.

<http://www.apeamac.com/exportaciones-de-aguacates-de-mexico-a-estados-unidos/>

Huacuja F. E. (2008). Abriendo fronteras: el auge exportador del aguacate mexicano a Estados Unidos. *Anales de Geografía de la Universidad Computense*, 28(1). Pp. 9-28.

Huang F., Chen G. Q., Hou X., Fu Y. S., Cai L., Hyde K. D. y Li H. Y. (2013) Colletotrichum species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Divers*, 61 Pp. 61–64.

Hui-Ling L. y Kuang-Ren C. (2008). Cellular toxicity of elsinochrome phytotoxins produced by the pathogenic fungus, *Elsinoë fawcettii* causing citrus scab. *New Phytologist* 177. Pp. 239–250.

Hyde K. D., Jones E. G., Liu J. K., Ariyawansa H., Boehm E., Boonmee S., Braun U., Chumnunti P., Crous P.W., Dai D.Q., Diederich P. Dissanayake A. Doilom M., Doveri F., Hongsanan S., Jayawardena R., LAWREYJ.D., Li Y. M., Liu Y.X., Lucking R., Monkai J., Muggia L., Nelsen M. P., Pang K. L., Phookamsak R., Senana I. C., Shearer C. A., Suetrong S., Tanaka K., Thambugala K. M., Wijayawardene N. N., Wikee S., Wu H., Zhang Y., Aguirre-Hudson B., Alias S.A., Aptroot A., Bahkali A.H., Bezerra J.L., Bhat D.J., Camporesi E., Chukeatirote E., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hirayama K. Hirayama S., Kang J., Knudsen K., Li W., Li X., Liu Z. y Mapook A. (2010). Families of dothideomycetes. *Fungal diversity*, 63 (1). Pp. 1-313.

INTA (Instituto nacional de innovación y transferencia en tecnología agropecuaria) (2016). Plan de manejo de trips en el cultivo de aguacate Hass. Costa Rica. Autor. Patricia Solís Calderón. Pp. 1-40.

Jenkins A. E. y Bitancourt A. A. (1941). Revised descriptions of the genera *Elsinoe* and *Sphaceloma*. *Mycologia*, 33. Pp. 338-340.

Jenkins A. E. (1925). A species of *Sphaceloma* on avocado. *Phytopathology*, 24. Pp. 84-85.

Jenkins A. E. (1934). *Sphaceloma perseae* the cause of avocado scab. Journal of Agricultural Research, 49. Pp. 859-869.

Jenkins A. E. (1939). Historical records of avocado Scab in Florida and Cuba. California Avocado Association 1939 Yearbook, 24. Pp. 76-78.

Katoh K. y Standley D. M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution, 30. Pp. 772–780.

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P. y Drummond A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics, 28. Pp. 1647–1649.

Korsgaard M., Glazowska S. E., Schiller M., Johnston P. R. y Lund O. S. (2014). “Topaz-spot” in Apple identified as “*Elsinoe* leaf and fruit spot” (*Elsinoe pyri* (Wor.) Jenkins). Reviewed Papers. Pp. 1-7.

Leyva-Mir G. (2020). Riesgos del uso de fungicidas en el cultivo del aguacatero (*Persea americana*). Memorias del XIII Congreso nacional del sistema producto aguacate 2020. (En línea).

Li Y., Wu H., Chen H. y Hyde K. D. (2011). Morphological studies in Dothideomycetes: *Elsinoë* (Elsinoaceae), Butleria, and three excluded genera. Mycotaxon, 115. Pp. 507–520.

Maddison W. P. y Maddison D. R. (2016). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis version 3.6. [Internet]. Available from: <http://mesquiteproject.org>

Maldonado F. I., Ramírez J. F., Rubi M., Antonio X., Lara A. V., Acosta A. D., Rivera R. y Ávila A. L. (2017). Modelling the spatial behavior of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) in growing avocado. International Journal of experimental botany. Pp 99-111.

Marroquín-Pimentel F. (1999). Factores que favorecen la incidencia de roña (*Sphaceloma perseae* Jenk.) en el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill.) 'Hass', en tres regiones agroclimáticas de Michoacán, México. Ed. revista Chapingo Serie Horticultura, 5. Pp. 309-312.

Martínez-Hernández M. S., Morales-García J. L., Pedraza-Santos M. E. y Morales-Montelongo K. L. (2017). Control químico in vitro de los patógenos relacionados con el síndrome de roña en aguacate en diferentes zonas de Michoacán, México. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate, Ciudad Guzmán, Jalisco, México. Pp 193-196.

McNeill J. y Turland N. J. (2011). Mayor changes to the Code of Nomenclature-Melbourne, July 2011. XVIII International Botanical Congress, 60 (5). Pp 1495-1497.

Miranda E. y Sandoval I. (2000). Desarrollo de un método rápido y sencillo para el aislamiento de ADN de especies fúngicas que afectan al arroz y el tabaco Fitosanidad, 4 (1-2). Pp 107-108.

Moncalvo J. M., Lutzoni F. M., Rehner S. A., Johnson J. y Vilgalys R. (2000). Phylogenetic Relationships of Agaric Fungi Based on Nuclear Large Subunit Ribosomal DNA Sequences. SYSTEMATIC BIOLOGY, 49. Pp. 278-305.

Moncalvo J. M., Rehner S. A. y Vilgalys R. (1993). Systematics of Lyophyllum section Difformia based on evidence from culture studies and ribosomal DNA sequences. Mycologia, 85. Pp. 788-794.

Morales-García J. L. (2000). La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) y la roña (*Sphaceloma perseae* Jenk) del aguacate en Michoacán, México: Epidemiología, predicción y caracterización. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados en Ciencias agrícolas. Texcoco, México.

Morales-García J. L. (2015). Enfermedades del aguacate. Memorias del 3º Congreso del Aguacate 26-28 de agosto 2015. Ciudad Guzmán, Jalisco, Mexico. Pp. 1-11.

Morales-García J. L. (2017). Estado actual de las enfermedades del fruto del aguacate en México: roña y antracnosis. Memorias del v congreso Latinoamericano del Aguacate. 04-07 de septiembre 2017. Ciudad Guzmán, Jalisco, México. Pp 1-12.

Morales-García J. L. (2020). Estado actual de la mancha púrpura del fruto de aguacate en México. Memorias del XIII Congreso nacional del sistema producto aguacate 2020. Pp. 114-125. Consultado el 18 de noviembre del 2019. Recuperado de: http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_114.pdf

Morales-García J. L., Azpíroz-Rivero H. S. y Pedraza-Santos M. E. (2009). Cultural, morphological, pathogenic and isoenzymatic characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Isolates causing anthracnose on avocado (*Persea americana* Mill) in Michoacán, México. Revista UDO Agrícola, 9(4). Pp.848-856.

Muñiz-Villareal H. M. (2014). Control de hongos fitopatógenos de importancia agrícola utilizando como agente causal a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Maestría en ciencias biológicas con acentuación en microbiología, Universidad Autónoma de Nueva León. P 14.

Nylander J. A .A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Palmateer A. (2006). Description of disease: Avocado scab. Avocado Technical Assistance Curriculum. Homestead, FL, USA, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Pp. 1-77.

Pérez R. M. (2008). Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. The European Journal of Plant Science and Biotechnology, 2. Pp. 01-24.

Pérez-Álvarez S., Leyva-López N. E., Magallanes-Tapia M. A., Arce-Leal P. y Méndez-Guerrero A. (2016). Contaminant fungi *in vitro* establishment of potato apices. *Cultrop* 2016, 37(4). Pp.84-88. Consultado el 08 de mayo del 2021. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.26063.69284>.

Pérez-Martínez C., Rojas-Martínez R. I., Alatorre-Rosas R., Hernández-Rojas F. y Otero-Carolina G. (2013). Análisis de la variación intraespecífica de *Conidiobolus coronatus* usando RAPD y secuencias ITS. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 31 (6). Pp. 357-362.

Pernezny K. y Marlatt R. (2007). Diseases of avocado in Florida. Bulletin Florida Cooperative Extension Service, 21. P 3. .

Raciborski M. (1900). Parasitische algen auf Pilzen. Botanischen Institut zu Buitenzorg, Batavia.

Rademacher W., Jung J., Laatsch H., Rave-Frank M., Hedden P y Graebe J. E. (1982). Production of gibberellin A4 and other GAS by the fungus *Sphaceloma manihoticola*. In: Abstracts of the Eleventh International Conference on Plant Growth Substances, Aberystwyth, July 12-16.1982. Pp. 1-8.

Raja H. A., Miller A. N., Pearce C. J. y Oberlies N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. Journal of Natural Products, 80(3). Pp. 756–770.

Ramírez-Gil J. G., Castañeda-Sánchez D. A. y Morales-Osorio J. G. (2014). Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia, Colombia. Revista Ceres, 61. Pp 50-61.

Ramírez-Gómez M. y Rodríguez A. (2012). Plant defense mechanisms and responses in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: a review. Revista Colombiana de Biotecnología, 14(1). Pp. 271-284.

Redecker D. (2002) New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. Research in Microbiology, 153(3). Pp. 125-30.

Rodríguez-Campos J., Escobedo-Reyes A. y Lugo –Melchor O. Y. (2017) Inocuidad en aguacate. Repositorio CIATEJ. Pp. 165-186.

Roger A. J., Sandblom O., Ford-Doolittle F. y Philippe H. (1999). An evaluation of Elongation Factor 1 α as a Phylogenetic Marker for Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. Pp.228-232.

Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. A. y Huelsenbeck J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542.

Rosen D. (1990). Armored scale insects their biology, natural enemies and control. Amsterdam, Países Bajos. Elsevier Science Publisher B.V. P 386

Rossman A. Y., Allen W. C. y Castlebury L. A. (2016). New combinations of plant-associated fungi resulting from the change to one name for fungi. *IMA Fungus*, 7(1). Pp 1–7.

Salgado S. M. L. (1993). Problemas fitosanitarios del aguacate en Coatepec Harinas. *Memorias Centro de Investigaciones científicas y tecnológicas del aguacate en el Estado de Mexico*. Pp.191-212.

Sánchez-Colin S., Mijares-Oviedo P., López-López L. y Barrietos-Priego A. F. (2001). Historia del aguacate en México. *Memoria Fundación Salvador Sánchez Colin cictamex s. c., Coatepec Harinas, 1998-2001*. Pp. 171-187.

Schoch C. L., Seifert K. A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J. L., Levesque C. A. y Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16). Pp. 6241-6246.

Schweinitz L. D. (1834). Synopsis fungorum in America Borreali media degentium. Weinheim. J. Cramer. P. 232.

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) (2018). Manual de Identificación de las Principales Plagas del Aguacate en México. Tecámac, México: Autor: M. en C. Héctor Enrique Vega Ortiz,1. Pp 5-20.

Shenoy B. D., Rajesh J. y Hyde K. D. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity*. Pp. 1-54.

Silva-Rojas H. V. y Ávila-Quezada G. D. (2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60(5). Pp. 899–908.

Simard M., Rioux D. y Laflamme G. (2001) Formation of ligno– suberized tissues in jack pine resistant to the European race of *Gremmeniella abietina*. *Phytopathology*, 91. Pp.128–114.

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2019). Anuario estadístico de la producción agrícola. SADER. Consultado el 15 de enero del 2021. Recuperado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2020). Anuario estadístico de la producción agrícola. SADER. Consultado el 15 de enero del 2021. Recuperado de: http://www.siap.gob.mx/agricola_siap/icultivo/index.jsp.

Slobin L. I. (1980). The Role of Eucaryotic Elongation Factor Tu in Protein Synthesis. The Measurement of the Elongation Factor Tu Content of Rabbit Reticulocytes and Other Mammalian Cells by a Sensitive Radioimmunoassay. *European Journal of Biochemistry*, 110(2). Pp. 555–563.

Stevens H. (1918). Avocado scab. Florida Agricultural Experiment Station Bulletin, 289. Pp. 1-7.

Stevens H. E. (1922). Avocado diseases. Book. Fla. Agr. Expt. Sta. Bul.Pp 1-161.

Suarez C. E., Norimine J., Lacy P. y McElwain T. F. (2006). Characterization and gene expression of *Babesia bovis* elongation factor-1 α . *International Journal for Parasitology*, 36. Pp. 965-973.

Suh S. O. y Blackwell M. (1999). Molecular phylogeny of the cleithothecial fungi placed in Cephalothecaceae and Pseudeurotiaceae. *Mycologia*, 91. Pp. 836-848.

Tamayo-Molano P. J. (2007). Enfermedades del aguacate. Revista Politécnica, 3(4). Pp. 51-70.

Tamez-Guerra P., Galán-Wong L. J., Medrano-Roldán H., García-Gutiérrez C., Rodríguez-Padilla C., Gómez-Flores R. A. y Tamez-Guerra R. S. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Ciencia. Pp. 143-152.

Torres-Preciado V. H. (2009). La competitividad del aguacate mexicano en el mercado estadounidense. Revista de geografía agrícola, 43. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco México. Pp 61-79.

Valle-Aguirre G., Velázquez-del Valle M. G., Corona-Rangel M. L., Amora-Lazcano E. y Hernández-Lauzardo A. N. (2016). First aeromycological study in an avocado agroecosystem in Mexico. Aerobiologia, Pp. 657-667.

Vásquez M. A., Cruz-López L. y Chame-Vásquez E. R. (2000). First record of *Conotrachelus perseae* (Coleoptera: Curculionidae) in Comitán, Chiapas, Mexico. Florida Entomologist Society. Pp. 1252-1253.

Vitale A., Aiello D., Guarnaccia V., Perrone G., Stea G. y Polizzi G. (2012). First Report of Root Rot Caused by *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma* on Avocado (*Persea americana*) in Italy. Journal of Phytopathology, 160. Pp. 156-159.

Weiss U., Flon H. y Burger W.C. (1957). The photodynamic pigment of some species of *Elsinoe* and *Sphaceloma*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 69. Pp. 311-319.

White T. J., Bruns T. D. Lee S. B. y Taylor. J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. Copyright, Academic Press. Pp. 315-322

Zentmyer, G. A. (1984). Avocado diseases. Tropical Pest Management, 30(4). Pp. 388-400.

Zhang J., Xu T. y Ge Q. (2003). Notes on Pestalotiopsis from southern China. Mycotaxon, 85. P 99.

Zhi L., Huan D., Xiao Y., Jingyuan H., Zhiqi H. y Xiping W. (2018). Morphological characterization and optimization of conditions for conidial production of *Elsinoë ampelia*, the causal organism of grapevine anthracnose. Journal of phytopathology. Pp 1-9.