



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Identificación molecular de hongos asociados a la
roña en aguacate (*Persea americana*) a través del
análisis del gen *tef1***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARIANA REYES VÁZQUEZ

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo; en donde se realizó el presente trabajo, bajo la dirección de la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma.

Al Ing. Daniel Lino Martínez, propietario del huerto de traspatio en la comunidad de Magdalena Axocopan, Atlixco, Puebla; lugar donde se obtuvieron las muestras de frutos de aguacate.

Al laboratorio de Nemátodos Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, por el préstamo del equipo de microscopía.

Al Dr. Mark Earl Olson, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme usar el equipo de cómputo y los programas bioinformáticos para el análisis filogenético de las muestras.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Reyes
Vázquez
Mariana
5549994690
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309154233

2. Datos del tutor

Dra.
Valadez
Moctezuma
Ernestina

3. Datos del Sinodal 1

Dra.
Vélez
Aguilar
Patricia

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
Cervantes
Alcayde
María Angélica

5. Datos del Sinodal 3

M. en C.
Becerra
Morales
Diana

6. Datos del Sinodal 4

Dr.
Peraza
Reyes
Carlos Leonardo

7. Datos del trabajo escrito

Identificación molecular de hongos asociados a la roña en aguacate (*Persea americana*) a través del análisis del gen *tef1*
pp. 94
2018

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater, la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de estudiar a lo largo de estos años. Pertenecer a esta institución ha sido uno de los más grandes sueños cumplidos; y que hoy en día se traducen en logros. Por siempre estaré orgullosa de pertenecer a esta máxima casa de estudios

A la Universidad Autónoma Chapingo, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación. El abrirme las puertas del laboratorio de Biología Molecular determinó de manera positiva el desenvolvimiento de mi carrera científica.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma agradezco infinitamente el asesoramiento, apoyo y dirección en el desarrollo de esta investigación. El voto de confianza que depositó en mi a lo largo de la estancia, en conjunto con su inigualable calidad humana ayudaron a acercarme de la mejor manera al ámbito científico.

A la Dra. María Angélica Cervantes Alcayde un especial agradecimiento por la comprensión, paciencia, pero sobre todo por su interés y disposición que tuvo conmigo; desde las clases de Evolución, hasta hoy en día en el desarrollo de este proyecto. Gracias por el tiempo brindado para el análisis de los resultados de este proyecto; así también por sus críticas constructivas y sugerencias.

A la M. en C. Diana Becerra Morales, por la conducción y progreso en la parte técnica y teórica de este trabajo de investigación. Agradezco su inigualable paciencia y disposición en todo momento; así como también, las enseñanzas y conocimiento compartido.

A la Dra. Patricia Vélez Aguilar, por su tiempo, disposición y asesoramiento teórico en la culminación del proyecto. Los comentarios y recomendaciones sugeridas, mejoraron de manera exponencial esta investigación.

Al Biol. Ricardo Colín Núñez, por el asesoramiento, tiempo dedicado en el análisis de los resultados; y sobre todo, por las pláticas en salón y laboratorio que enriquecieron mi desempeño laboral y forjaron mi interés por la biología.

Al Dr. Carlos Leonardo Peraza, por su apoyo, atención y acertadas observaciones y recomendaciones que fueron enriquecedoras en el mejoramiento del proyecto.

A la Sra. Dolores Luna, por su tiempo y la asistencia técnica en la realización del trabajo.
Agradezco enteramente el gran apoyo que incentivo a nunca rendirme y ver de cada suceso una lección de vida: *Es cuestión de enfoques.*

DEDICATORIA

A mi papá **José Luis**, por ser uno de los dos mayores ejemplos a seguir y darme ese apoyo e ímpetu para seguir adelante en cada proyecto y objetivo que me propongo. Gracias pa' por creer en mí. "Mi papá es un genio" (since 1999).

A mi mamá **Rosario**, por el infinito amor que me demuestra día a día y a quien le agradezco la vida misma. Gracias ma' por darme tu mano cuando tambaleo y contagiarme desde que tengo memoria ese amor por la biología. Eres la voz de mi alma y nuestra conexión rebasa fronteras.

A mi hermana **Fernanda**, por ser el mejor regalo de Navidad, mi consejera, mi primera y mejor amiga, mi brazo derecho en cada travesura y decisión por tomar. Eres mi compañera de vida. Gracias por estar siempre para mí, con tu honestidad y sensatez. You know what: I got your bags; I love you so much my little sis.

A mi hermano **José Luis**, por tener el alma indomable y darme las palabras certeras en el momento oportuno. Porque con cada plática conozco tu corazón y reconozco el mío. Eres el significado de la sinceridad. Te quiero más de lo que imaginas Chepo.

A mi prima hermana **Victoria**, porque no importan los kilómetros que nos separen, el cariño viaja cual luz en el universo. Pinky and Brain. Vicky y Mariana, las eternas comadres.

A mis tíos: **July, Juan, Carmen y Silvia**; y a mis primos: **Pedro y Ricardo**, por su eterno apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de los años. Su cariño es tan cálido como el sol.

A mi abuelita **Julia**, mi segunda mamá, por cuidarme y estar ahí; junto a mí desde que tengo memoria, desde siempre. Mis primeros recuerdos son tuyos. ¡Sí se pudo abue!

A los amigos leales: **Alan**, porque desde tiempos memorables libramos juntos las dificultades, por alguna razón la vida nos pone retos paralelos en momentos convergentes. **Ceci**, por todas las porras y ser el mejor equipo que tuve en la carrera; Biología fue mejor contigo. Nuestra amistad vale oro.

A los amigos de años: **Ángel**, tú que haces de las dificultades oportunidades, gracias por coincidir en México, en el mundo y en mi vida. **Jasiel**, "Tilingolingo" gracias por la sensatez,

observaciones e interés, tenerte en mi vida me hace una persona muy afortunada. **Brenda**, por tu sincera amistad y acompañarme en los momentos decisivos.

A los colegas: **Uziel**, por alegrarme los días durante carrera y en temporada post. **Monze** porque cada experiencia (experimento); bueno o malo fue mejor en conjunto “Libres y soberanas”. **Moi**, porque cada encuentro “random” que tenemos, es un recordatorio que la vida está conformada de retos, y como tal debemos de buscar las herramientas para superarlos y aprender de cada uno de ellos.

A los amigos certeros: **Paloma**, “amigui”, por cada risa, consejo y tardes de trabajo que compartimos. **Esteban**, el hermano mayor que la vida me dio la oportunidad de conocer, agradezco los innumerables consejos en todo momento. **Karen**, “gemela ambiental”, gracias por todo el apoyo brindado y tu invaluable amistad.

Al equipo que se conformó en el laboratorio de Biología Molecular: **Diana, Erick, Christiam, Jorge y Aldo**, porque a pesar del tiempo transcurrido, fueron una pieza fundamental en el desarrollo del experimento; no solo en el ámbito académico, sino personal. Especialmente agradezco a **Alex** por cada plática mantenida sobre biología, proyectos, miedos y aspiraciones; pero sobre todo por contagiarme con su alegría y positividad en el momento que más lo necesitaba. Cada “Perfect” fue reconfortante para mi ser. Gracias a todos por cada enseñanza dada día a día, cada aventura, cada shock, cada carcajada, cada buen rato lleno de conocimiento. Son las personas las que le dan significado al momento y lugar; y ustedes hicieron que “Texcoco” fuera una etapa excepcional en todo el sentido de la palabra.

Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought.

Albert Szent-Györgi

The oldest and strongest kind of fear is fear of the unknown.

H.P Lovecraft

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación taxonómica del aguacate de acuerdo con Cronquist (1981).
- Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *E. perseae* (Jenkins) Rossman & W.C. Allen (2016).
- Tabla 3.** Reactivos y volumen utilizados en la reacción de PCR para la amplificación del gen *tef1*.
- Tabla 4.** Reactivos empleados para la realización del gel de acrilamida al 8%.
- Tabla 5.** Número de acceso y nombre científico de las secuencias utilizadas en el estudio.
- Tabla 6.** Tamaño estimado en pares de bases (pb) de los fragmentos generados por la enzima *HaeIII*.
- Tabla 7.** Tamaño estimado en pares de bases (pb) de los fragmentos generados por la enzima *AluI*.
- Tabla 8.** Caracterización morfológica y análisis Blast con las secuencias reportadas en GenBank y Q-Bank con el mayor porcentaje de similitud y cobertura.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Flor de aguacate (*Persea americana* Mill.) (Tomado de Chanderbali *et al.*, 2008).
- Figura 2.** Lesiones de roña en fruto, tallo y hojas de aguacate (Tomado de Jenkins, 1934).
- Figura 3.** Fruto de aguacate, raza hortícola mexicana proveniente de Atlixco, Puebla, México. Muestra con síntomas de roña. Las lesiones color marrón oscuro forman áreas corchosas.
- Figura 4.** Cultivo perteneciente a *E. perseae* en medio PDA con 25 días de crecimiento a 20°C (Tomado de Everett *et al.*, 2011).
- Figura 5.** Conidióforo y conidios de *E. perseae* (Tomado de Jenkins, 1934).
- Figura 6.** Representación esquemática de la actividad del factor de elongación de la traducción 1- α (EF-1 α) en la síntesis de proteínas en eucariotas (Tomado y modificado de

Riis *et al.*, 1990).

Figura 7. Mapa del gen *tef1* de *Trichoderma reesei* (No. de acceso CAA80554), y localización de la gama de *primers* utilizados para amplificar diferentes regiones de *tef1* (Tomado y modificado de Druzhinina & Kubicek, 2005).

Figura 8. Fruto de aguacate raza hortícola mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*) proveniente de la huerta de traspatio en la localidad de Magdalena Axocopan, Atlixco, Puebla, México.

Figura 9. Ubicación geográfica del área de recolección de las muestras de aguacate. Localidad de Magdalena Axocopan, municipio de Atlixco, Puebla, México. (Tomado de Google Maps, 2018).

Figura 10. A) Árbol de aguacate. B) Fruto de aguacate. Ambos de la raza hortícola mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), provenientes de la huerta de traspatio en la localidad de Magdalena Axocopan, Atlixco, Puebla, México. El fruto presenta la sintomatología característica de la roña.

Figura 11. Programa de amplificación para el gen *tef1* a través de la técnica de PCR.

Figura 12. Muestra fúngica etiquetada como A2. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología del micelio observada a 40X.

Figura 13. Muestra fúngica etiquetada como B6. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología del micelio observada a 40X.

Figura 14. Muestra fúngica etiquetada como C6. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología del micelio observada a 40X.

Figura 15. Muestra fúngica etiquetada como D8. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología de los conidios observada a 40X.

Figura 16. Muestra fúngica etiquetada como E2. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología de los conidios observada a 40X.

Figura 17. Muestra fúngica etiquetada como G1. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología del micelio observada a 40X.

Figura 18. Amplificación por PCR del segmento del gen *tef1* de las 29 muestras de hongos etiquetados de la A1-G2, con el uso de los *primers* EF1-729F (*forward*) y EF2 (*reverse*). En el carril (-) se observa el control negativo. Marcador de peso molecular 1kb en los carriles 1° y 31°.

Figura 19. PCR-RFLPs obtenidos de la digestión enzimática del amplificado del gen *tef1* con el uso de la enzima de restricción *HaeIII*. Muestras fúngicas etiquetadas de la A1-G2. Marcadores de peso molecular de 100 pb (1° carril) y 1kb (31° carril).

Figura 20. PCR-RFLPs obtenidos de la digestión enzimática del amplificado del gen *tef1* con el uso de la enzima de restricción *AluI*. Muestras fúngicas etiquetadas de la A1-G2. Marcadores de peso molecular de 100 pb (1° carril) y 1kb (31° carril).

Figura 21. Dendrograma generado a partir de la digestión del fragmento amplificado del gen *tef1* con el uso de las enzimas: *HaeIII* y *AluI*. Construcción basada en el método de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente de Dice (1945) / Nei-Li (1979). El soporte de la topología con un *bootstrap* de 1000 repeticiones. Valores de distancia genética se muestra sobre las ramas.

Figura 22. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima Verosimilitud obtenido del alineamiento de 12 secuencias de nucleótidos del gen *tef1* (Orden Mucorales). Modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros con una distribución discreta de Gamma (K2+G). Valores de *bootstrap* con 1000 repeticiones se muestran sobre las ramas. Grupo externo *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 23. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima Verosimilitud obtenido del alineamiento de 12 secuencias de nucleótidos del gen *tef1* (Subclase Pleosporomycetidae). Modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros con una distribución discreta de Gamma (K2+G). Valores de *bootstrap* con 1000 repeticiones se muestran sobre las ramas. Grupo externo *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 24. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima Verosimilitud obtenido del alineamiento de 7 secuencias de nucleótidos del gen *tef1* (Subclase Hypocreomycetidae). Modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros con una distribución discreta de Gamma (K2+G). Valores de *bootstrap* con 1000 repeticiones se muestran sobre las ramas. Grupo externo *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 25. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima Verosimilitud obtenido del alineamiento de 21 secuencias de nucleótidos del gen *tef1* (Subclase Xylariomycetidae). Modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros con una distribución discreta de Gamma (K2+G). Valores de *bootstrap* con 1000 repeticiones se muestran sobre las ramas. Grupo externo *Saccharomyces cerevisiae*.

ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EF-1 α	Factor de elongación de la traducción 1- α
Ha	Hectarea
ITS	Internal Transcribed Spacers (Espaciadores Transcritos Internos)
Mm	Milimolar
min	Minuto
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
ml	Mililitros
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng	Nanogramos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Papa Dextrosa Agar
pb	Pares de bases
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
rpm	Revoluciones por minuto
tRNA	RNA de transferencia

<i>tef1</i>	Gen del factor de elongación de la traducción 1- α
TAE	Tris/acetato/EDTA
Taq	Polimerasa termoestable aislada de <i>Thermus acuaticus</i>
ton	Tonelada
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
volts	Voltios
X	Veces la concentración

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Aguacate	3
3.1.1 Taxonomía	5
3.1.2 Botánica	6
3.1.3 Origen y distribución	8
3.1.4 Importancia agronómica del aguacate en México	8
3.1.5 Estudio de las enfermedades del aguacate	9
3.1.6 Enfermedades de importancia en la producción de aguacate	9
3.1.6.1 Roña en aguacate	10
3.1.6.2 Sintomatología	11
3.1.6.3 Agente fitopatógeno causal	12
3.2 Identificación molecular de los hongos	14
3.2.1 Generalidades de los hongos	14
3.2.2 Técnicas de identificación morfológica	15
3.2.3 Marcadores de DNA	16
3.2.4 Técnicas de identificación molecular	17
3.2.4.1 PCR	17
3.2.4.2 PCR-RFLPs	17
3.2.4.3 Secuenciación	18
3.2.5 Genes como marcadores de DNA	19
3.2.5.1 Factor de elongación de la traducción 1- α	19
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
5. JUSTIFICACIÓN	23
6. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general	24

6.2	Objetivos específicos	24
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1	Material Vegetal	25
7.2	Área de recolección y manejo de las muestras de aguacate	25
7.3	Aislamiento de hongos asociados a la roña	27
7.4	Caracterización morfológica de los hongos	28
7.5	Identificación molecular de los hongos	28
7.5.1	Extracción de DNA	28
7.5.2	Amplificación del gen <i>tef1</i>	29
7.5.3	Análisis de fragmentos obtenidos por PCR-RFLPs	30
7.5.4	Secuenciación	32
7.5.5	Edición y alineamiento de las secuencias del gen <i>tef1</i>	32
7.5.6	Análisis filogenético	32
8.	RESULTADOS	33
8.1	Caracterización morfológica de los hongos	33
8.2	Identificación molecular de los hongos	40
8.2.1	Amplificación por PCR del gen <i>tef1</i>	40
8.2.2	Agrupación de muestras a través del análisis PCR-RFLPs	40
8.2.3	Análisis Blast para la identificación molecular	43
8.2.4	Análisis filogenético con el gen <i>tef1</i>	46
9.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	51
10.	CONCLUSIONES	58
11.	PERSPECTIVAS	59
12.	ANEXOS	60
13.	REFERENCIAS	63

1. RESUMEN

La roña es una enfermedad fúngica que afecta principalmente la cáscara del aguacate, sin dañar la calidad de la pulpa. Los síntomas se observan en frutos recién formados hasta desarrollados, donde se aprecian lesiones de color pardo o marrón claro de aspecto corchoso y forma irregular, que al unirse entre sí, llegan a cubrirlo en su totalidad. A nivel mundial el hongo *Sphaceloma perseae*, renombrado *Elsinoë perseae*, se ha reportado como agente causal de la enfermedad. Sin embargo, en México no se ha confirmado la presencia de este fitopatógeno. Actualmente existe la incertidumbre si es el único agente causal de la roña en el aguacate. Con el fin de identificar a nivel molecular el o los hongos asociados a los síntomas en fruto, se seleccionaron 18 aguacates de la región de Atlixco, Puebla. A cada aguacate se le realizaron cortes histopatológicos del pericarpio para posteriormente aislar y purificar los hongos asociados. Se obtuvieron 29 aislados fúngicos, de los cuales se realizó extracción de DNA y se analizó mediante PCR-RFLPs para determinar la distancia genética entre ellos; con ello se conformaron 6 grupos diferentes. La identificación de los aislados se realizó a nivel molecular a través de la secuenciación del gen *tef1*. Con base en el análisis filogenético se identificaron los hongos a niveles jerárquicos supraespecíficos diferentes, debido a la resolución del marcador molecular. Estos son pertenecientes a los géneros (*Peyronellaea*, *Colletothricum* y *Arthrinium*), familia (Pestalotiopsidaceae), orden (Mucorales), y subclase (Pleosporomycetidae). Asimismo, aunque con los resultados obtenidos no se reconoce al agente causal reportado, este es parteaguas para evaluar el efecto de los hongos identificados en el desarrollo de la enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) también conocido como palta, cura, avocado o abacate, es una especie arbórea polimórfica, perenne de tallo aéreo (o epígeo) con características leñosas, follaje siempre verde y raíz superficial (Calabrese, 1992).

La producción del aguacate está relacionada a países de clima cálido y templado, aunque la mayor parte de sus cultivos se encuentran en los países latinoamericanos, debido a que es una especie originaria de América. La distribución natural de este cultivo es desde México hasta Chile, pasando por Centroamérica, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (Gutiérrez-Díez *et al.*, 2009).

Los fitopatógenos son los organismos que producen enfermedades en plantas (Trigos *et al.*, 2008). Las enfermedades pre y postcosecha del aguacate están entre los factores que más limitan la producción y demeritan la calidad del fruto, cuyo principal mercado es el de exportación. La importancia de un organismo fitopatógeno varía dependiendo del país, región productora y el tipo de mercado (nacional o internacional), y puede estar dada por la distribución y severidad de daños que los patógenos ocasionan o por su importancia cuarentenaria para un país importador. En general el establecimiento y diseminación de enfermedades en un huerto de aguacate obedece a un mal manejo del cultivo (Téliz & Mora, 2013).

El primer grupo de fitopatógenos por su número e importancia son los hongos, produciendo pérdidas del 20-50% (FHIA, 2007). Entre las enfermedades fúngicas de mayor interés, por su frecuencia y severidad para este cultivo, destaca la roña, que aparentemente es causada por *Sphaceloma perseae* Jenkins (Jenkins, 1934), renombrado como *Elsinoë perseae* (Jenkins) Rossman & W.C. Allen (Rossman, Allen, & Castlebury, 2016), causante de pérdidas importantes en el campo al deteriorar la calidad del fruto. Los síntomas de la roña se presentan como lesiones superficiales, irregulares de color pardo o marrón claro, de apariencia corchosa, levemente erupientes, que pueden unirse y afectar gran parte del fruto, sin dañar la calidad de la pulpa (Tamayo, 2007). Sin embargo, se tiene reportado que el agrietamiento de las áreas afectadas favorece el ingreso de otros organismos, y su

valor comercial (Dann, Ploetz, Coates, & Pegg, 2013).

La identificación de fitopatógenos es indispensable para dilucidar la interacción patógeno-planta y así generar estrategias agronómicas de control y manejo de las enfermedades (Boyd, Ridout, O'Sullivan, Leach, & Leung, 2013). En la identificación de microorganismos, las características morfológicas han sido la base para su determinación. Sin embargo, para la caracterización de especies, cepas, variedades o biotipos es necesario evaluar características tales como patogenicidad, propiedades bioquímicas e inmunológicas o secuencias de nucleótidos del DNA genómico (Wiwik, Dewa, Made, & Made, 2013).

Actualmente los marcadores moleculares son una herramienta útil para la investigación agronómica, debido a que permiten identificar, clasificar y analizar la variabilidad genética de un material vegetal o fúngico (Gutiérrez -Díez *et al.*, 2009). Las técnicas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las más eficaces para la detección de patógenos en plantas (Wiwik *et al.*, 2013). Para ello, puede ser estudiado el gen del factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*), el cual codifica una parte esencial de la maquinaria de traducción de las proteínas, y tiene una alta utilidad filogenética a nivel de resolución intra especies (O'Donnell *et al.*, 2009; Salazar, Serna & Gómez, 2016), debido a que presenta una única copia dentro del genoma de los organismos, y tasas de cambio altas en las regiones intrónicas (Gomes *et al.*, 2002). Así también, los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) son de gran utilidad para detectar mutaciones dentro de los sitios de restricción, generando cambios en los patrones de fragmentos al comparar varios genomas (Valadez & Kahl, 2000) y de esta manera observar variabilidad y distancias genéticas entre los organismos.

A pesar de que a nivel mundial el hongo *Elsinoë perseae*, se ha reportado como agente causal de la enfermedad, en México no se ha confirmado la presencia de este fitopatógeno en aguacates enfermos. Por lo tanto, existe la incertidumbre acerca de su identidad y como único agente causal de la roña en el aguacate (Everett, Rees-George, Pushparajah, Manning, & Fullerton, 2011; Alfaro *et al.*, 2015). Con ello, el objetivo primordial de este trabajo de investigación es aislar e identificar los hongos

asociados a los síntomas de roña en aguacates de la raza mexicana a través del marcador molecular: *tef1*.

3. ANTECEDENTES

3.1. Aguacate

3.1.1. Taxonomía

El nombre de aguacate deriva de la palabra nahua “AHUACA CUAHUITL”, árbol de testículos (Robelo, 1904; Téliz & Mora, 2013). Así también, recibe otros nombres como *palta* en Sudamérica, *avocado* o *avocado pear* en japonés e inglés, *avocatier* en francés y *abacate* en portugués (Rodríguez, 1982).

El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia Lauraceae, uno de los grupos de angiospermas más antiguos y numerosos, con alrededor de 50 géneros descritos y un número indeterminado de especies que varía de 2500 a 3000 (Bergh & Ellstrand, 1986; Rohwer, 1993; Guzmán *et al.*, 2017) predominantemente arbóreas que se distribuyen por todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Renner, 2004).

El género *Persea* se divide en dos subgéneros: *Persea* y *Eriodaphne*. Ambos se diferencian por la pubescencia de los tépalos. *Persea* tiene ambas caras pubescentes, mientras que *Eriodaphne* la superficie adaxial de los tres tépalos externos es glabra. El subgénero *Persea*, conocido como el de los verdaderos aguacates, produce frutos de mayor tamaño con relación a *Eriodaphne* (Kopp, 1966).

Persea americana Mill, como la mayoría de los miembros de la familia Lauraceae se caracteriza por su variabilidad morfológica (Knight & Campbell, 1999). Esta especie posiblemente dio lugar a tres y probablemente más variedades que desarrollándose en aislamiento geográfico dieron lugar a diferentes variedades botánicas o razas hortícolas (Storey, Berg, & Zentmyer, 1986). Estas están determinadas por aspectos morfológicos, geográficos, fisiológicos, bioquímicos y comerciales (Ashworth, Chen, & Clegg, 2011): Raza Mexicana (*P. americana* var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) Blake), Raza Guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis* L. Wms) y Raza Antillana (*P. americana* var. *americana* Mill) (Scora *et al.*, 2002; Ashworth *et al.*, 2011; Ayala & Ledesma, 2014; Guzmán *et al.*, 2017). Además, dentro de *P.*

americana, otros taxa como la var. *nubigena* (L. Wms) Koop (Kopp,1966) y la var. *costaricensis* Ben-Ya'acob (Ben-Ya'acob, Solis-Molina & Bulfler, 2003) también son reconocidos (Galindo-Tovar, Ogata-Aguilar, & Arzate-Fernández, 2008).

Estas variedades y su hibridación han dado origen a los cultivares modernos del aguacate (Knight & Campbell, 1999) de importancia económica como es el caso de la var. Hass y Fuerte.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del aguacate de acuerdo con Cronquist (1981).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Lurales
Familia	Lauraceae
Género	<i>Persea</i>
Subgénero	<i>Persea</i>
Especie	<i>P. americana</i>

3.1.2. Botánica

Persea americana Mill es una especie polimórfica, cuyos caracteres morfológicos son muy variables (dimensión de la hoja, tamaño del fruto, coloración del epicarpio, etc.). A continuación de acuerdo a Rodríguez (1982) se describen los caracteres botánicos generales.

El aguacate es un árbol perenne de tallo aéreo (o epigeo) con características leñosas y follaje siempre verde, su raíz es superficial y llega a crecer a una altura de 10 a 12 metros en su hábitat natural.

Las hojas son simples y enteras, de forma elíptica alargada y nervadura pinnada (de pluma). La inserción en el tallo es peciolada. Cuando es joven presenta un color rojizo (contenido de pigmentos en las vacuolas) y una epidermis pubescente; al llegar a la madurez estas hojas se tornan lisas, coriáceas y de un verde intenso y oscuro.

Las ramas son abundantes, generalmente delgadas y frágiles por lo que se pueden romper al cargar muchos frutos y por la acción del viento.

Las flores son hermafroditas (poseen ambos sexos), actinomorfas (simétricas) de color verde amarillento y con un diámetro aproximado de 1 cm. El perianto es indiferenciado con dos verticilos de tres tépalos cada uno, tres verticilos de estambres y un verticilo de estaminodios que rodean un único carpelo central (Chanderbali *et al.*, 2008)

El androceo está compuesto por 12 estambres insertos por debajo del ovario o alrededor del mismo. De estos estambres solo 9 son funcionales. El gineceo posee un solo pistilo y un ovario súpero (por encima del pedúnculo) unilocular.

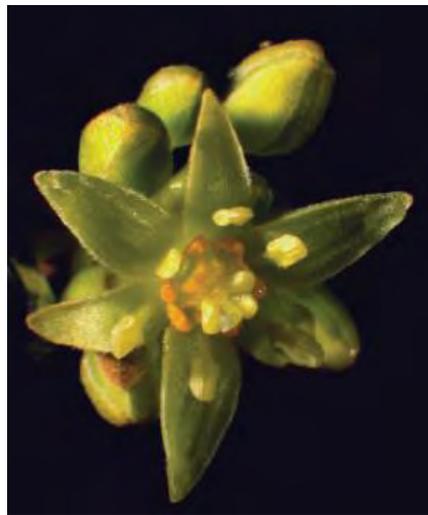


Figura 1. Flor de aguacate (*Persea americana* Mill.) (Tomado de Chanderbali *et al.*, 2008).

La inflorescencia (agrupación de las flores) es una panícula (racimo de racimos) que puede ser axilar o terminal. Se estiman unas 200 flores por panícula. En la parte superior de la panícula se encuentra una yema vegetativa que luego se desarrolla en rama.

El fruto es una baya que posee un pericarpio (delgado, grueso o quebradizo), un mesocarpio carnoso (con porcentaje de grasa que varía de 5 a 30%) y el hueso (protección seminal). Su forma es variada, pudiendo ser piriforme esférica u ovalada. El color también varía: verde, violáceo o rojizo. El peso oscila de 50 gramos a 2.5 kg.

3.1.3. Origen y distribución

El aguacate es nativo de América. El árbol se originó en Mesoamérica en la región alta del centro de México y Guatemala (Williams, 1977). Prueba de ello es la presencia y distribución de los posibles aguacates primitivos y parientes silvestres cercanos de las especies *P. schiedeana* Nees y *P. steyermarkii* C.K. Allen (Bergh, 1992) localizados en la región.

La domesticación del aguacate también se llevó a cabo en Mesoamérica y tal vez con el intercambio comercial entre las civilizaciones nativas, se distribuyó y adaptó a Centro América, extendiéndose hasta Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú, en donde y fue encontrado por los españoles.

Es una especie subtropical perenne que se ha adaptado a diferentes climas, extendiendo su producción a América del Norte, América del Sur, el Caribe, Asia, África, Medio Oriente y Europa (Guzmán *et al.*, 2017). Por lo tanto, en la actualidad ya se encuentra distribuido en los cinco continentes (Téliz & Mora, 2013).

3.1.4. Importancia agronómica del aguacate en México

México es el mayor productor y exportador a nivel mundial de aguacate. Representa más de un tercio de la producción mundial y la superficie cosechada (Guzmán *et al.*, 2017), con valores de 1,889,354 ton en 180,536 ha, respectivamente (FAO, 2016). Recientemente, el consumo del fruto ha aumentado significativamente debido a que tiene un valor económico y nutricional importante.

La importancia socioeconómica del aguacate deriva del beneficio económico que derrama entre productores, comercializadores, industrializadores y consumidores; al generar empleos a través de la demanda de mano de obra en cada sector.

El aguacate por su excelente valor nutricional, se ha certificado como un alimento saludable que se recomienda como fuente dietética de grasa. Contiene un alto contenido de aceite (3-30%, dependiendo de la variedad) y constituye un suministro

de proteínas, minerales, carbohidratos y vitaminas. Así mismo, los aceites del aguacate también son muy valorados en la industria cosmética (Knight Jr., 2002).

Por lo mencionado anteriormente, el valor del aguacate en el mercado internacional ha crecido sostenidamente, dejando de ser una fruta exótica para incorporarse en la dieta básica de muchos países (Téliz & Mora, 2013).

3.1.5. Estudio de las enfermedades del aguacate

Los hongos son los patógenos de mayor importancia en las plantas, ya que causan pérdidas significativas en la producción agrícola (Sexton & Howlett, 2006). En especial, el cultivo aguacatero es altamente susceptible a enfermedades de origen fúngico (Valle-Aguirre, Velázquez-del Valle, Corona-Rangel, Amora-Lazcano, & Hernández-Lauzardo, 2016) en todas las etapas de la vida del árbol (crecimiento, desarrollo y producción), siendo más evidentes los daños en la madurez fisiológica de los frutos. Factores importantes son la susceptibilidad del cultivar de aguacate o el portainjerto, las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de la enfermedad (tales como la humedad y temperatura), y el nivel de enfermedad, haciendo referencia a la incidencia del patógeno y gravedad (Scora *et al.*, 2002). Identificar los fitopatógenos y la interacción con su huésped, en este caso el aguacate, es fundamental para el desarrollo de opciones de manejo fitosanitario.

3.1.6. Enfermedades de importancia en la producción de aguacate

Los árboles y frutos del aguacate son susceptibles a varias enfermedades fúngicas. Una de las de mayor importancia en precosecha es la roña, causada por *Sphaceloma perseae* Jenkins, en donde los síntomas se muestran como lesiones en la superficie superior e inferior de hojas jóvenes y de tipo corchoso, marrón e irregulares en los frutos (Jenkins 1935; Ávila-Quezada *et al.*, 2003). También, se presenta el marchitamiento vascular causado por especies de *Verticillium* (Inderbitzin *et al.*,

2011). En los árboles afectados, las hojas y las ramas aparecen manchas marrones durante varias semanas (Pérez-Jiménez, 2008). En algunos casos, *Cercosporapurpurea* Cooke o *Pseudocercosporapurpurea* Cooke (Deighton, 1976) producen pequeñas manchas angulares en los márgenes foliares, inicialmente de color marrón y posteriormente púrpura, y las lesiones en los frutos aparecen como manchas rodeadas de halos amarillos (Deighton, 1976; Pérez-Jiménez, 2008). Las enfermedades postcosecha más importantes en el aguacate son causadas por *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp. Anteriormente, en México, *Fusarium oxysporum* Schldl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. fueron aislados de huertos de aguacate en el estado de Michoacán y ambas especies produjeron pequeñas manchas oscuras con polvo blanco sobre plantones de aguacate inoculados (Ceja-Torres, Téliz-Ortiz, Osada-Kawasoe & Morales-García, 2000). Por otra parte, la antracnosis, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, y *Colletotrichum boninense* Moriwaki, Toy. Sato y Tsukib., afecta gravemente la producción de aguacate (Silva-Rojas & Ávila-Quezada, 2011). Además, recientemente se ha identificado un nuevo agente causal, *Colletotrichum godetiae* Neerg., que afecta los frutos de aguacate (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015). Los síntomas observados incluyen manchas marrón-negras en el exocarpo y pudrición blanda en el mesocarpo, independientemente de la especie de *Colletotrichum* aislada.

3.1.6.1. Roña en aguacate

La roña es una de las enfermedades de mayor importancia. Es de amplia distribución en varios países, dañando la apariencia comercial del fruto y reduciendo significativamente su precio de venta. Por su incidencia y escaso control fitosanitario, esta impacta negativamente en los costos del cultivo (Téliz & Mora, 2013).

Fue reportada por primera vez en el estado de Florida en 1918 (Stevens, 1918). Actualmente se encuentra presente en Brasil, Perú, México, Puerto Rico, Cuba, Haití y en el Continente Africano. En Estados Unidos se ha registrado en California y en

Florida, donde representa la segunda enfermedad de tipo fúngico con mayor importancia (Zentmyer, 1959; Gallegos, 1983; Morales & Vidales, 1994).

Esta enfermedad se ha observado en las regiones aguacateras de México en los estados de Michoacán, Puebla, México, Morelos, y Nayarit. La incidencia puede ser del 100% y la severidad promedio de 3.7% (Ávila-Quezada *et al.*, 2002).

3.1.6.2. Sintomatología

La roña en aguacate es una enfermedad que ocasiona lesiones en ambos lados de la superficie de las hojas jóvenes, cáscara de los frutos y tallo (Jenkins, 1934).

En los frutos, se presenta como lesiones costrosas o corchosas con coloraciones que varían de pardo, marrón claro a negro de hasta 3mm de diámetro generalmente de forma circular a oval (Jenkins, 1934); puede que estén esparcidas, pero se unen para forman áreas extendidas irregulares que frecuentemente cubren totalmente la superficie del fruto (Burnett, 1974; Palmateer, 2006).

El haz de las hojas es más susceptible que el envés (Jenkins, 1934). Las infecciones en el envés comienzan en la nervadura central y laterales. Las lesiones a menudo son rojas y el centro frecuentemente se rompe ocasionando la formación de perforaciones. El daño de las hojas es más frecuente en la parte más alta del árbol (Pernezny & Marlatt 2007).

Se ha examinado la sintomatología en frutos al 1 mes de formación, con ruptura de la epidermis y producción de conidios hialinos y conidióforos que forman una cobertura densa y aterciopelada de color verde oliva oscuro. En el envés de las hojas la masa de conidios es de color marrón claro a verde oliva. Sin embargo, es difícilmente observable la capa aterciopelada debido a que se pierde gradualmente por acción de la intemperie y solo los conidios permanecen (Jenkins, 1934).

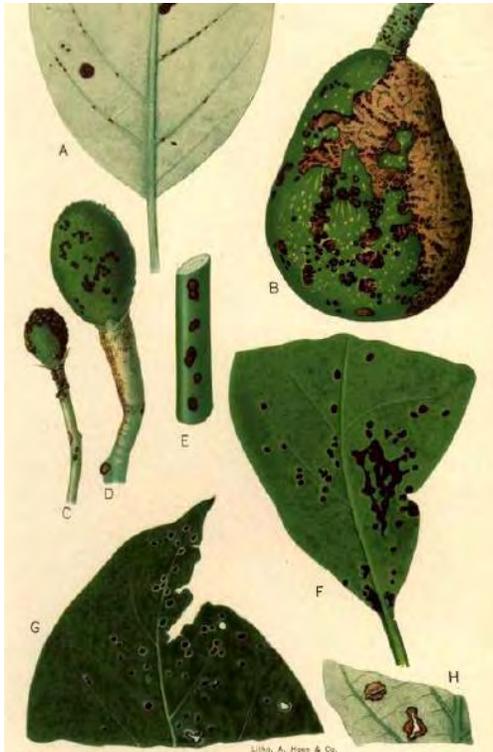


Figura 2. Lesiones de roña en fruto, tallo y hojas de aguacate (Tomado de Jenkins, 1934).



Figura 3. Fruto de aguacate, raza hortícola mexicana proveniente de Atlixco, Puebla, México. Muestra con síntomas de roña. Las lesiones color marrón oscuro forman áreas corchosas.

3.1.6.3. Agente fitopatológico causal

El hongo ascomiceto *Sphaceloma perseae* Jenkins fue reportado como agente causal de la roña en aguacate (Everett *et al.*, 2011). Sin embargo para establecer un solo

nombre científico como lo exige el *Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas* (McNeill *et al.*, 2012) se propuso una actualización clasificatoria, colocándolo dentro del género *Elsinoë* (fase sexual), debido a que este es comúnmente aplicado a los fitopatógenos que causan la enfermedad de la roña en diversos frutos y por ende ha sido adoptado en la literatura reciente (Li, Wu, Chen, & Hyde, 2011, Crous *et al.*, 2013) En la actualidad ambos son considerados sinónimos (Wijayawardene *et al.*, 2014; Rossman *et al.*, 2015).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *E. perseae* (Jenkins) Rossman & W.C. Allen (2016).

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Dothideomycetes
Subclase	Dothideomycetidae
Orden	Myriangiales
Familia	Elsinoaceae
Género	Elsinoë
Especie	<i>E. perseae</i>

Elsinoë perseae se caracteriza morfológicamente por formar conidios hialinos, con forma ovoide a oblongoelipsoide, a veces bigutulados, de aproximadamente 5-8 × 3-4 µm (Jenkins, 1934). El crecimiento fúngico en PDA es lento y produce colonias convuladas. Los cultivos son oscuros en la parte inferior de las placas, y las colonias son de color beige claro (Palmateer, 2006; Everett *et al.*, 2011).



Figura 4. Cultivo perteneciente a *E. perseae* en medio PDA con 25 días de crecimiento a 20°C (Tomado de Everett *et al.*, 2011).



Figura 5. A) Conidióforo de *E. perseae*. B) conidios a 100X (Tomado de Jenkins, 1934)

3.2. Identificación molecular de los hongos

3.2.1. Generalidades de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes cosmopolitas que exhiben una gran diversidad en morfología, ecología y ciclos de vida (Alexopoulos, Mims, & Blackwell, 1996; Ainsworth, Bisby, & Kirk, 2008). Las células fúngicas tienen paredes celulares caracterizadas por la presencia de quitina (Lene, 2010). Si bien, la mayoría de las especies crecen como filamentos multicelulares llamados hifas, y todas las hifas juntas forman el micelio, algunas especies (como las levaduras) también crecen como células individuales. La reproducción sexual y asexual de los hongos es común a través de varios tipos de esporas, a menudo producidas en estructuras especializadas, como los conidióforos y cuerpos fructíferos de hongos (Burnett 1976, (Alexopoulos *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2005; Ainsworth *et al.*, 2008). Los hongos están considerados como quimioheterótrofos estrictos. Son incapaces de fotosintetizar y por consiguiente necesitan sustratos ricos en nutrientes. Su nutrición es por absorción (Moore, Robson, & Trinci, 2011), por ello necesitan estar inmersos en el sustrato del cual se alimentan, en donde liberan exoenzimas como las oxidasas e hidrolasas que les permiten degradar moléculas grandes y relativamente insolubles como los carbohidratos, proteínas y lípidos para convertirlos en moléculas simples para posteriormente absorberlas a través de la pared y membrana celular (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Con base a la actividad que realizan en los ecosistemas, la mayoría son saprófitos, es decir, se alimentan de materia orgánica muerta. Otros pueden establecer relaciones simbióticas de varios tipos con otros organismos; estas pueden ser mutualistas cuando la asociación es benéfica para los que intervienen, o parasitarias cuando el único beneficiado es el hongo en detrimento de su hospedero (Cepero, Restrepo, Franco-Molano, Cárdenas, & Vargas, 2012).

Los hongos, si bien, son responsables del reciclaje de nutrientes y la fertilidad del suelo, también tienen un gran valor económico y social puesto que se han utilizado durante siglos en la industria alimentaria, textil y médica. Sin embargo, también juegan un papel importante en la salud humana y protección vegetal debido a que son de los principales agentes causales de diversas enfermedades (Singara, 2015; Adamowicz, 2015).

En el ámbito agronómico, los hongos desempeñan papeles tanto positivos como negativos. Sin embargo, las actividades perjudiciales tienen mayor peso. Se sabe que alrededor de 20,000 enfermedades de las plantas de cultivo son causadas por hongos. Por lo tanto, contar con una identificación rápida y precisa de especímenes fúngicos es de vital importancia para la prevención y control de patógenos fúngicos (Adamowicz, 2015).

3.2.2. Técnicas de identificación morfológica

La identificación de hongos se ha realizado con base a la descripción morfológica (caracteres fenotípicos), de las estructuras productoras de esporas formadas como resultado de la reproducción (Hyde, Abd-Elsalam, & Cai, 2011). Principalmente en laboratorio se desarrollan las características morfológicas de la fase asexual; por lo tanto, la identificación de los anamorfos se basa principalmente en la morfología del conidio y en el proceso de conidiogénesis (Hennebert & Sutton, 1994).

Así también la diversidad genética en los hongos puede evaluarse con la observación de otras características morfológicas, tales como el nivel de organización celular

(unicelular, pluricelular o dimórfico), características del talo (filamentoso o no), características del micelio (tamaño micro o macroscópico; forma amorfa o definida; septos ausentes o presentes; situación aérea o profunda; aspecto algodonoso, aterciopelado, terroso, húmedo, seco; coloreado o sin color; consistencia blanda, papirácea, carnosa, etc). Algunos caracteres son bastante estables, pero la gran mayoría son variables debido a que son influenciados por el ambiente, además de que es difícil encontrar suficientes marcadores morfológicos para realizar un estudio de variabilidad confiable y difícilmente su identificación llega a nivel de especie. Por lo tanto, la certeza de las clasificaciones es ambigua y poco confiable (Lutzoni *et al.*, 2004).

3.2.3. Marcadores de DNA

Los avances de la biología molecular durante la década de los 80, han aportado una clase de marcadores que permiten detectar diferencias tangibles entre las secuencias homólogas y conservadas del DNA de los organismos. Este tipo de marcadores que visualiza variaciones genéticas se les denomina: marcadores de DNA. En el genoma de los hongos resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman esta molécula (Valadez & Kahl, 2000), como eventos de sustitución, inserción, delección, transposición y rearrreglos en regiones génicas (Piercey-Normere & Egger, 2001).

En los últimos años, el uso de métodos moleculares en el diagnóstico clínico y agronómico de hongos, principalmente las técnicas basadas en la obtención de marcadores de DNA (Bridge, Spooner & Roberts, 2005; Hibbett & Taylor, 2013), ha surgido como una respuesta a los problemas asociados con el sistema de identificación fenotípica existente (Fernández-Ortuño, Loza-Reyes, Atkins, & Fraaije, 2010).

3.2.4. Técnicas de identificación molecular

Para estudiar la variación genética de los hongos, se han desarrollado diversas técnicas de biología molecular (Piercey-Normere & Egger, 2001), entre estas se encuentra la PCR; basada fundamentalmente en la obtención de grandes cantidades de regiones particulares de DNA. Aunque como tal no es una herramienta de análisis, se puede caracterizar el DNA amplificado. Por ejemplo, en el área de diagnóstico, el uso de *primers* específicos, que únicamente se alinean con el DNA de cierto organismo, determinan la presencia/ausencia de un producto y por ende la identificación de este. Del mismo modo el uso de *primers* universales que generan productos diferenciales por tamaño y número, son referidos como huellas de DNA (Mullis *et al.*, 1986).

Sin embargo, con mayor frecuencia el análisis de la región amplificada se lleva a cabo mediante el uso de enzimas de restricción o directamente con la secuenciación.

3.2.4.1. PCR

La PCR (Polymerase Chain reaction) es una técnica desarrollada por Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986; Weising, Nybom, Wolff & Kahl, 2005) que permite la amplificación exponencial de millones de copias de secuencias específicas de DNA; mediante ciclos repetidos de desnaturalización, alineamiento y extensión a diferentes temperaturas utilizando *primers* específicos, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) y una DNA Taq polimerasa termoestable en el amortiguador o *buffer* adecuado (Mullis *et al.*, 1986; Valadez & Kahl, 2000).

3.2.4.2. PCR-RFLPs

El análisis con RFLP se usa ampliamente para la detección de variación de secuencias de DNA entre especies. Consiste en la generación de perfiles de bandas específicas de una especie a través de la digestión del DNA con una o más enzimas

de restricción (Botstein, White, Skolnick, & Davis, 1980). Estas enzimas de restricción rompen la molécula de DNA en sitios de reconocimiento de 4-6 pares de bases (pb) específicos, originando un conjunto de fragmentos con diferentes longitudes que podrían separarse de acuerdo a tamaño molecular mediante electroforesis. El perfil RFLP distintivo de cada especie es el resultado de la distribución genómica única de los sitios de reconocimiento (generados o eliminados por sustituciones de una sola base) y la distancia entre ellos (que varía debido a reordenamientos genómicos grandes, como translocaciones, elementos transponibles o tándem y duplicaciones (Pereira, Carneiro, & Amorim, 2008).

Con el advenimiento de la técnica de reacción de PCR (Mullis *et al.*, 1986) el análisis de RFLP, conocido como PCR-RFLPs, se ha utilizado rutinariamente para la detección de especies (Zehner, Zimmermann, & Mebs, 1998; Wolf, Rentsch, & Hübner, 1999) cuando se compara con los fragmentos digeridos de DNA de organismos previamente identificados.

3.2.4.3. Secuenciación

La secuenciación automática de Sanger se lleva a cabo en una única reacción que implica un templado de DNA monocatenario, *primers* específicos, los cuatro 2'-desoxinucleótidos estándar (dATP, dTTP, dCTP Y dGTP), 2',3'-didesoxinucleótidos marcados con fluoróforos (ddATP, ddTTP, ddCTP Y ddGTP) y DNA polimerasa. Para ello la polimerasa sintetiza una cadena complementaria al DNA molde añadiendo los desoxinucleótidos; sin embargo, cuando los didesoxinucleótidos son incorporados por la DNA polimerasa, se interrumpe la síntesis de la cadena de DNA en crecimiento, dando como resultado la generación de un conjunto de fragmentos que difieren en unidades de nucleótidos (Metzker, 2005; Adams, 2008). A medida que estos fragmentos marcados pasan por electroforesis capilar a través de un detector, los fluoróforos son excitados por un láser en el secuenciador, produciendo emisiones de fluorescencia de cuatro colores diferentes. La detección proporciona un electroferograma que muestra la secuencia del DNA original (Metzker, 2010).

3.2.5. Genes como marcadores de DNA

Los genes que codifican proteínas se han utilizado ampliamente para construir filogenias moleculares que ayudan en la identificación y clasificación de taxones (Lutzoni *et al.*, 2004; Hibbett *et al.*, 2007; Schoch *et al.*, 2009), ya que permiten un fácil reconocimiento de homología y convergencia. En la mayoría de los casos, especialmente en los hongos, estos genes están presentes en una sola copia, son menos variables en su longitud debido a que acumulan menos mutaciones en sus exones (Berbee & Taylor 2001; Einax, 2003), cuentan con regiones intrónicas que a veces evolucionan a un ritmo más rápido en comparación a la región espaciadora interna transcrita (ITS) del DNA ribosomal (Geiser *et al.*, 2004), y para algunos organismos se emplean en análisis filogenéticos debido a su mejor resolución en niveles taxonómicos superiores en comparación con los genes rRNA (Schoch *et al.*, 2009).

Algunos marcadores utilizados en la identificación de hongos son las regiones de genes que codifican para las dos subunidades de RNA polimerasa II (*RPB1*) y (*RPB2*) (Stiller & Hall, 1997; Matheny, Liu, Ammirati, & Hall, 2002; Reeb, Lutzoni, & Roux, 2004), el factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*) (Rehner & Buckley, 2005) y la beta-tubulina (*tub2*) (Glass & Donaldson, 1995; O'Donnell & Cigelnik, 1997) se han usado con mayor frecuencia para inferir relaciones filogenéticas entre hongos (Hibbett *et al.*, 2007; Schoch *et al.*, 2009)

3.2.5.1. Factor de elongación de la traducción 1- α

El gen del factor de elongación de la traducción 1- α (*tef1*) codifica una parte esencial de la maquinaria de traducción proteica (Geiser *et al.*, 2004), cuya función principal es promover la unión del aminoacil-tRNA (aa-tRNA) al ribosoma en un proceso dependiente de GTP (Moldave, 1985).

El factor de elongación de la traducción 1- α (EF-1 α) es un componente del proceso de síntesis de proteínas en eucariotas y arqueobacterias. Es catalogado como una

proteína G, que en conjunto con GTP, se une al aa-tRNA y lo lleva al sitio A del complejo preformado: ribosoma-mRNA-peptidil-tRNA para la síntesis de la cadena proteica. En el momento en que se da la unión del codón y el anticodón, el ribosoma actúa como un activador de la actividad GTP-asa, estimulando la hidrólisis de GTP, y dando como resultado la liberación del GDP unido a EF-1α del ribosoma (Pittman *et al.*, 2006).

Así también, la interacción EF-1α-actina está plenamente conservada desde las levaduras a mamíferos, sugiriendo la importancia del EF-1α en la integridad del citoesqueleto (Kinzy, Ripmaster, & Woolford, 1994; Pittman, Kandl, Lewis, Valente, & Kinzy, 2009).

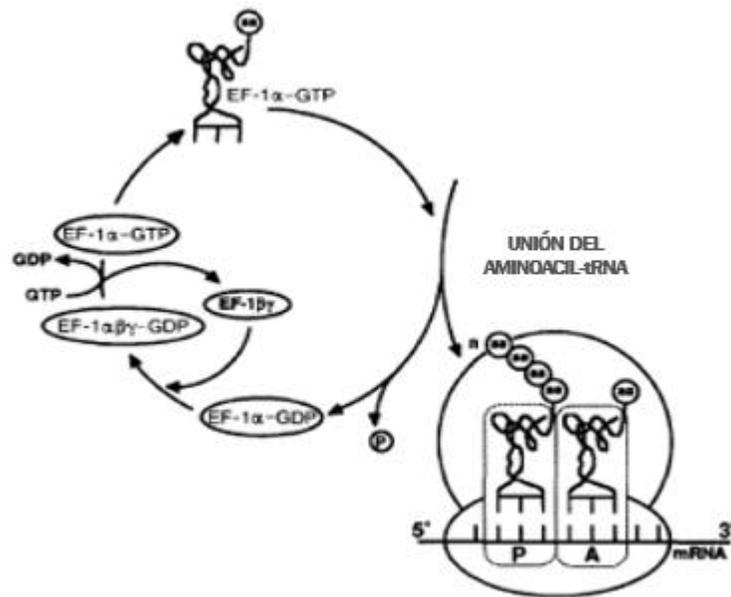


Figura 6. Representación esquemática de la actividad del factor de elongación de la traducción 1-α (EF-1α) en la síntesis de proteínas en eucariotas (Tomado y modificado de Riis *et al.*, 1990).

Este gen fue inicialmente utilizado como marcador filogenético para inferir relaciones a nivel de especie y género dentro de *Lepidoptera* (Mitchell *et al.*, 1997), siendo empleado por primera vez en hongos para investigar linajes dentro del complejo *F. oxysporum* (O'Donnell, Cigelnik, & Casper, 1998). Actualmente *tef1* es considerado como el gen esencial en análisis multigénicos en una amplia variedad de hongos (Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2004), debido a que codifica para una proteína ubicua altamente conservada con propiedades idóneas para la inferencia de

relaciones filogenética (Roger, Sandblom, Doolittle, & Philippe, 1999) Tiene presencia universal en organismos eucariontes y cuenta con una única copia del gen dentro del genoma (Baldauf & Doolittle, 1997). Además, se ha demostrado que es un gen útil para resolver relaciones filogenéticas a nivel de especie, así como en divergencias más profundas (Druzhinina & Kubicek, 2005).

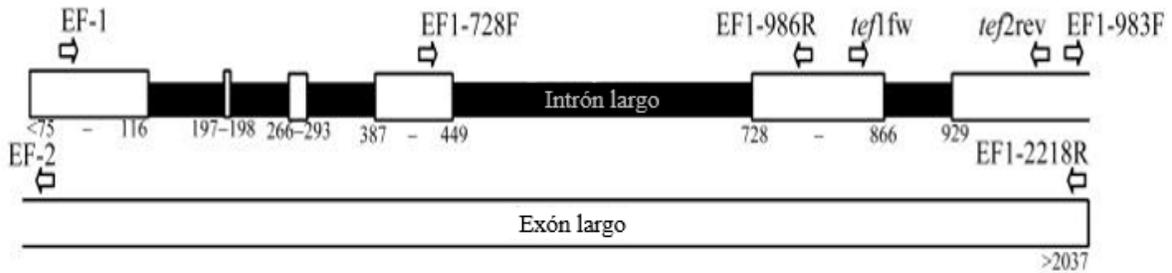


Figura 7. Mapa del gen *tef1* de *Trichoderma reesei* (No. de acceso CAA80554), y localización de la gama de *primers* utilizados para amplificar diferentes regiones de *tef1* (Tomado y modificado de Druzhinina & Kubicek, 2005).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es el 1° productor y exportador de aguacate a nivel mundial (Guzmán *et al.*, 2017) con una aportación del 45.95% del valor de las exportaciones mundiales y una derrama económica al país de \$50 848 millones (SAGARPA, 2017). La importancia del fruto en el mercado nacional e internacional ha crecido sostenidamente, dejando de ser una fruta exótica para incorporarse en la dieta de muchos países. Esta tendencia se ha reforzado por la importancia mundial del creciente consumo de productos naturales (Téliz & Mora, 2013). Sin embargo, la roña es una de las enfermedades fúngicas de mayor importancia en el cultivo del aguacate, debido a que produce grandes pérdidas económicas desde la fase de precosecha.

A pesar de que a nivel mundial el hongo *Elsinoë perseae*, se ha reportado como agente causal de la enfermedad, en México no se ha confirmado la presencia de este fitopatógeno en aguacates enfermos. Por lo tanto, existe la incertidumbre acerca de su identidad y como único agente causal de roña en el aguacate (Everett *et al.*, 2001; Alfaro *et al.*, 2015).

5. JUSTIFICACIÓN

La capacidad de identificar correctamente a los organismos responsables de enfermedades específicas de los cultivos, como lo es la roña, es de suma importancia, debido a que la falta de información y esclarecimiento acerca del patógeno *E. perseae* como único agente causal en el aguacate es una barrera que tiene como consecuencia el mal manejo de la enfermedad que se tiene en México. Por lo tanto, haciendo uso de técnicas moleculares como son la PCR y secuenciación del marcador molecular *tef1*, se identificarán los hongos asociados a la sintomatología de la roña con el fin de aumentar el conocimiento sobre la biodiversidad de los hongos posiblemente fitopatógenos y establecer estrategias para el control y saneamiento de los cultivos de aguacate.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Identificar molecularmente los aislados fúngicos obtenidos de frutos de aguacate con síntomas de roña mediante el gen *tef1*.

6.2. Objetivos específicos

- Aislar los hongos de secciones del pericarpio de frutos afectados con roña.
- Describir morfológicamente los aislados fúngicos.
- Obtener DNA y amplificar por PCR el gen *tef1* de los aislados fúngicos.
- Generar agrupamientos de los genotipos obtenidos mediante el análisis de PCR-RFLPs.
- Determinar la especie a la que pertenecen los hongos aislados a través de la construcción de árboles filogenéticos utilizando las secuencias del gen *tef1*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

La raza hortícola mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia* (Schltdl & Cham) Blake) corresponde a árboles de hasta 15 m de altura, se caracteriza por tener un fruto de aproximadamente 0.5kg, 4-12 cm de largo, cáscara muy delgada con tonalidades que van del morado al negro con verde oscuro; y hojas y pulpa con un aroma parecido al anís. El periodo de floración se presenta de enero a febrero, la temporada de maduración de junio a octubre. El desarrollo del fruto toma de 6 a 8 meses con una maduración en el árbol. A nivel geográfico se encuentra distribuido en las regiones montañosas centrales de México con adaptación al clima tropical y subtropical. Como principal ventaja la raza mexicana tiene tolerancia al frío, así como su alto contenido de aceite. (Scora *et al.*, 2002; Ashworth *et al.*, 2011; Ayala & Ledesma, 2014; Guzmán *et al.*, 2017).



Figura 8. Fruto de aguacate raza hortícola mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*) proveniente de la huerta de traspatio en la localidad de Magdalena Axocopan, Atlixco, Puebla, México.

7.1. Área de recolección y manejo de las muestras de aguacate

El sitio de recolección de las muestras de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) pertenece a la localidad de Magdalena Axocopan, en el municipio de Atlixco, estado de Puebla, dentro de la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico; con coordenadas 18° 48' y 19° 00' de latitud Norte y 98° 19' y 98° 36' de longitud

Oeste y una altitud entre 1 600 y 3 000 m. Esta región tiene un clima templado subhúmedo, con una temperatura media anual de 18°C y una precipitación de 1000mm. El uso de suelo y vegetación del área están caracterizadas principalmente por cultivos agrícolas (INEGI, 2009).

Para el manejo de muestras se utilizaron 18 frutos de aguacate con síntomas de roña obtenidas de 6 árboles de diferentes accesiones, localizados en una huerta de traspatio en el mes de octubre del 2016.

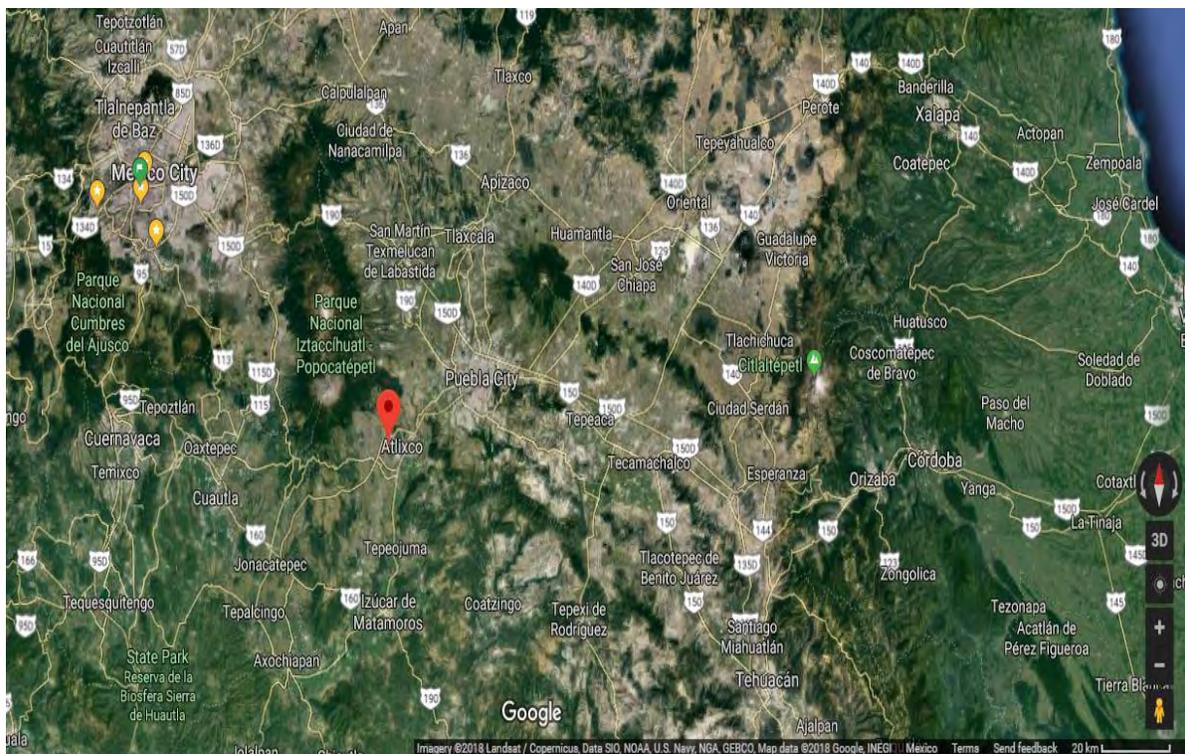


Figura 9. Ubicación geográfica del área de recolección de las muestras de aguacate. Localidad de Magdalena Axocopan, municipio de Atlixco, Puebla, México. (Tomado de Google Maps, 2018).

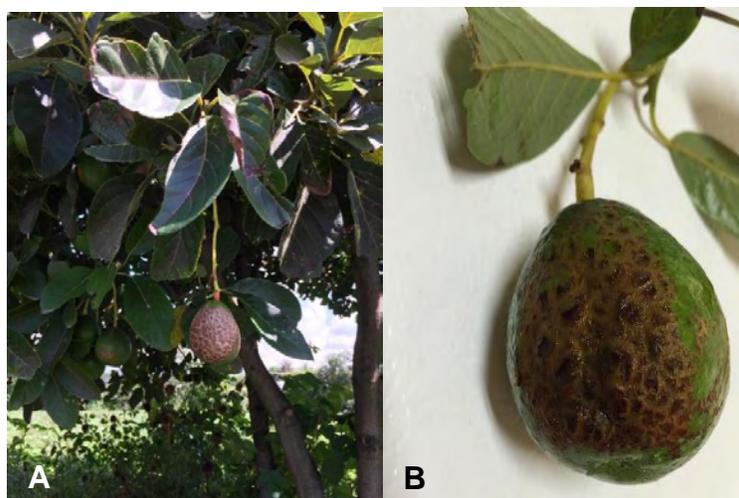


Figura 10. A) Árbol de aguacate. B) Fruto de aguacate. Ambos de la raza hortícola mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), provenientes de la huerta de traspatio en la localidad de Magdalena Axocopan, Atlixco, Puebla, México. El fruto presenta la sintomatología característica de la roña.

7.2. Aislamiento de hongos asociados a la roña

Los frutos de aguacate se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 min. Después se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril en campana de flujo laminar durante 40 min, para eliminar la mayor cantidad de humedad en los frutos.

Se cortaron trozos cuadrados de aproximadamente 1x1cm (en condiciones inocuas) de la cascara con tejido sintomático, y asintomático (control negativo), para ser cultivados en cajas Petri con medio de cultivo PDA (BD BIOXON) + ácido láctico (2.5mL/L). Concluido este paso, se incubaron las cajas a 22 °C durante 5 días.

La obtención de los aislados se realizó mediante cultivos monoconidiales (Laurentin & Martínez-Hilder, 2012); a través de la técnica de inoculación con sacabocados para obtener trozos de micelio de 0.5cm de diámetro y colocarlos en cajas Petri con medio de cultivo PDA únicamente. Los cultivos se resembraron cada 15 días para un mantenimiento puro e idóneo en cajas Petri con medio de cultivo PDA, almacenados a temperatura de 22°C con ciclos alternados de luz/oscuridad.

7.3. Caracterización morfológica de los hongos

Se elaboró una descripción macroscópica detallada de los aislados a los 15 días de crecimiento.

Para la observación microscópica, en la que se hace referencia a estructuras reproductivas, esporas e hifas, se aplicó la técnica de “Cinta Adhesiva”, la cual consistió en sostener una tira de cinta de 4 cm con unas pinzas. El lado adhesivo se presionó firmemente contra la superficie de la colonia del hongo a estudiar. La tira de cinta se colocó en un portaobjetos para su posterior observación con el microscopio óptico (Olympus CX31-P).

7.4. Identificación molecular de los hongos

7.4.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo a través del método de CTAB 2% (Weising *et al.*) con modificaciones.

Se colectó el micelio de los aislados purificados y se depositó en tubos Eppendorf de 2mL para después agregar a cada uno de ellos 500µL de nitrógeno líquido y macerarlo con pistilo (previamente desinfectado con alcohol al 96%).

Posteriormente se agregó 1mL de CTAB 2% + 0.2 % β-Mercaptoetanol, se mezcló por inversión e incubó a baño maría por 90 min a 65°C en agitación constante.

A cada tubo se le agregó 500µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezclaron por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min.

El sobrenadante formado se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL evitando el rompimiento de la interfase y se agregó ½ del volumen total de isopropanol frío. Posteriormente se incubó -20°C por 18 h.

Se centrifugaron los tubos con DNA precipitado a 13200 rpm por 30 min y se desechó el sobrenadante. El pellet formado se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 13 200 rpm por 8 min. El sobrenadante se decantó cuidadosamente para no perder el pellet previamente formado.

Los tubos permanecieron invertidos sobre papel absorbente hasta que el pellet secó. Posteriormente, a cada tubo se le adicionó entre 50-100 µL de buffer TE y se mantuvo a -20°C.

La calidad e integridad del DNA se diagnosticó en geles de agarosa al 1%, mientras que la concentración de DNA se determinó con el espectrofotómetro A 260 nm en Nanodrop ND-1000 V3.5.2 (Coleman Technologies Inc. for Nanodrop Technologies).

7.4.2. Amplificación del gen *tef1*

El gen *tef1* se amplificó por PCR con el uso de los *primers* EF1-728F: CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG (Carbone & Kohn 1999) y EF-2: GGA RGT ACC AGT SAT CAT GTT (O'Donnell, Kistler, Cigelnik, & Ploetz, 1998), sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT). La reacción de PCR se estandarizó para en un volumen final de 25 µL por muestra, conteniendo 8.2 µL de agua HPLC, 1X GoTaq® Buffer, 200 µM dNTPs, 5 mM MgCl₂, 4 µM de cada *primer*, 1.5 U/µL GoTaq® DNA Polymerase (Promega), y 40ng/µL de ADN. El volumen final utilizado por cada reactivo se señala en el Anexo (Tabla 3).

A continuación, se presenta el programa de amplificación efectuado en el termociclador automático modelo Maxygene (Axygene).

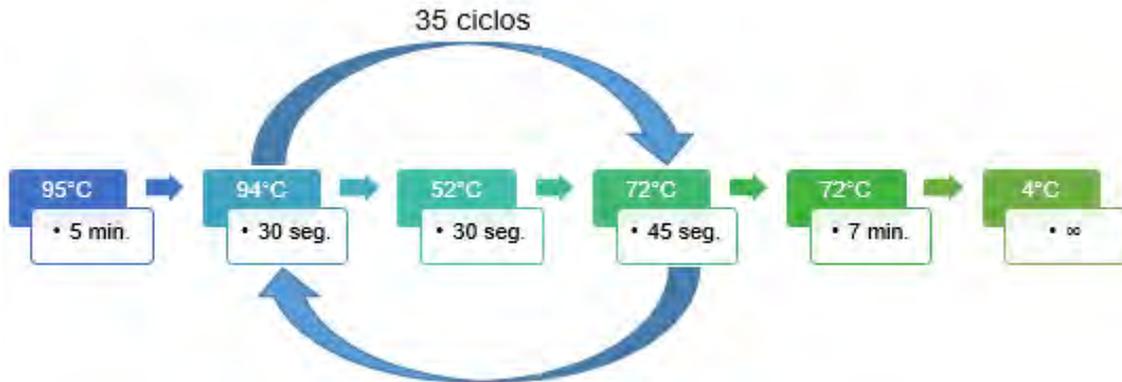


Figura 11. Programa de amplificación para el gen *tef1* a través de la técnica de PCR.

El producto de amplificación se visualizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% con buffer TAE 1X, corrido a 90 volts durante 1 hr. Para revelar las bandas, el gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio durante 15 min. Las imágenes fueron fotodocumentadas empleando el programa Quantity One (BioRad). El tamaño de las bandas se calculó tomando como referencia los marcadores de peso molecular o *ladders* de 1 kb (Invitrogen), colocados en los 2 pozos exteriores. Los productos amplificados se conservaron a 4°C para sus posteriores análisis.

7.4.3. Análisis de fragmentos obtenidos por PCR-RFLPs

Los productos amplificados del gen *tef1* de cada muestra se sometieron a un análisis de PCR-RFPLs. Cada uno de ellos se digirieron con las enzimas de restricción *HaeIII* (Promega) y *AluI* (Promega) de manera independiente. Se preparó la mezcla de digestión en un volumen final de 20 μ L en la que se agregó 3 μ L del fragmento de DNA amplificado de cada muestra, 0.2 μ L de BSA, 2 μ L de Buffer 10X, 0.2 μ L Enzima 10U/ μ L, 14.6 de agua HPLC.

Los componentes de la reacción se depositaron en tubos Eppendorf de 50 μ L de volumen y se mezclaron cuidadosamente de acuerdo a las sugerencias del fabricante, se dio un pulso de centrifuga a cada tubo con la reacción previamente descrita y se incubó a 37°C por 16 h.

Los productos de digestión se visualizaron por electroforesis vertical en geles de

acrilamida al 8% que consisten en acrilamida-bisacrilamida (29:1), TBE 5X, agua destilada estéril, TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2- diamine (Thermo Fisher Scientific)) y APS al 10% (SIGMA) (Anexo. Tabla 4). La electroforesis se realizó con buffer de corrida TBE 1X a 245 volts por 1.5 h.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se desmontaron y fueron colocados en bandejas para sumergirlos durante 15 min en la solución fijadora (Etanol al 10%+Ácido Acético al 1%), y posteriormente enjuagarlos con agua estéril. Se cubrieron con la solución de tinción (Nitrato de plata al 0.2%) y fueron puestos durante 15 min en agitación. Posteriormente se retiró dicha solución para un segundo enjuague con agua estéril. Finalmente se añadió la solución reveladora (Hidróxido de sodio al 3%) y 500 µL de formaldehído, y se mantuvieron en agitación hasta el revelado de las bandas. El tamaño de los fragmentos digeridos se calculó tomando como referencia los marcadores de peso molecular o *ladder* de 100 pb y 1 kb (Invitrogen), colocados cada uno en los 2 pozos exteriores. Los productos digeridos se conservaron a 4°C para sus posteriores análisis.

Para determinar los polimorfismo, se calcularon los patrones de los fragmentos con respecto al peso molecular de cada banda y analizaron a través de la generación una matriz binaria, asignando el valor de 0 o 1 a la ausencia y presencia de las bandas, respectivamente para un determinado peso molecular.

Posteriormente con el uso del programa bioinformático FreeTree (Pavlíeek *et al.*, 1999) se construyó un dendrograma con el método de agrupamiento UPGMA, basado en el índice de distancia genética (similitud) usando el coeficiente de Dice (1945) / Nei-Li (1979). El soporte de la topología interna se realizó mediante análisis de *bootstrap* con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). El dendrograma generado se visualizó y editó usando el software FigTree 1.4.2 (Rambaut, 2014).

Con base en las distancias genéticas obtenidas en el dendrograma, se formaron grupos y se seleccionó a un integrante de cada uno, con el fin de disminuir el número de muestras a secuenciar.

7.4.4. Secuenciación

Los productos amplificados de PCR que provienen de las muestras seleccionadas con base en el dendrograma obtenido con el análisis de PCR-RFLPs, fueron secuenciados empleando el servicio de la compañía Macrogen, Corea del Sur (www.macrogen.com/kor) con un secuenciador ABI Prism 3730XL (Applied Biosystems, Inc).

7.4.5. Edición y alineamiento de las secuencias del gen *tef1*

Por cada aislado fúngico se generaron las secuencias consenso a través del software bioinformático Sequencher 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

Posteriormente, para cada una de las muestras fúngicas elegidas, se realizó el análisis Blast para la búsqueda de secuencias similares previamente identificadas a nivel taxonómico con base en lo reportado en las bases de datos de: GenBank, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y Q-bank (<http://www.q-bank.eu>) (Anexo. Tabla 5), así como también se llevó a cabo una comparación con las secuencias reportadas que compartían el mayor porcentaje .

De forma consiguiente se generaron alineamientos múltiples de las secuencias consenso de las muestras junto con las secuencias de taxones de referencia reportados, utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar *et al.*, 2004). Posteriormente estas alineaciones se corrigieron y ajustaron a ojo utilizando el programa Se-Align v.2.0a11 Carbon (Rambaut, 2002).

7.4.6. Análisis filogenético

Los arboles filogenéticos se construyeron con base al algoritmo de Máxima Verosimilitud, donde se consideraron en el análisis todos los nucleótidos o caracteres y los gaps se trataron como datos faltantes; así también se seleccionó Kimura 2 parámetros como mejor modelo de sustitución de nucleótidos para el cálculo de distancias genéticas. El soporte de la topología se estimó mediante el análisis de

bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985), todo ello empleando el software de análisis genético MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

RESULTADOS

8.1. Caracterización morfológica de los hongos

La caracterización de los 29 aislamientos fúngicos provenientes del tejido sintomático de roña de aguacates de raza mexicana se realizó según la morfología de colonias de los cultivos fúngicos, las características de las esporas y/o las estructuras reproductivas (Barnett & Hunter, 1998). Con base a estas características, se clasificaron en 6 grupos o taxones morfológicos diferentes, de los cuales 5 de ellos fueron caracterizados a nivel de género, tomando como referencia la información obtenida por las claves taxonómicas de Barnett & Hunter (1998), y las descripciones compiladas por Alexopoulos (1996), Cepero *et al.* (2012), y Herrera & Ulloa (2013). Entre los géneros identificados se encuentran: *Mucor*, *Alternaria*, *Phoma*, *Peyronellaea* y *Pestalotiopsis*. Los aislamientos restantes fueron catalogados según el criterio de Lacap, Hyde, & Liew, (2003) como *Mycelia sterilia*, debido a la ausencia de estructuras reproductivas en el medio de cultivo. A continuación, se describe detalladamente cada uno de ellos.

Género *Mucor*: A1, A2 y A3

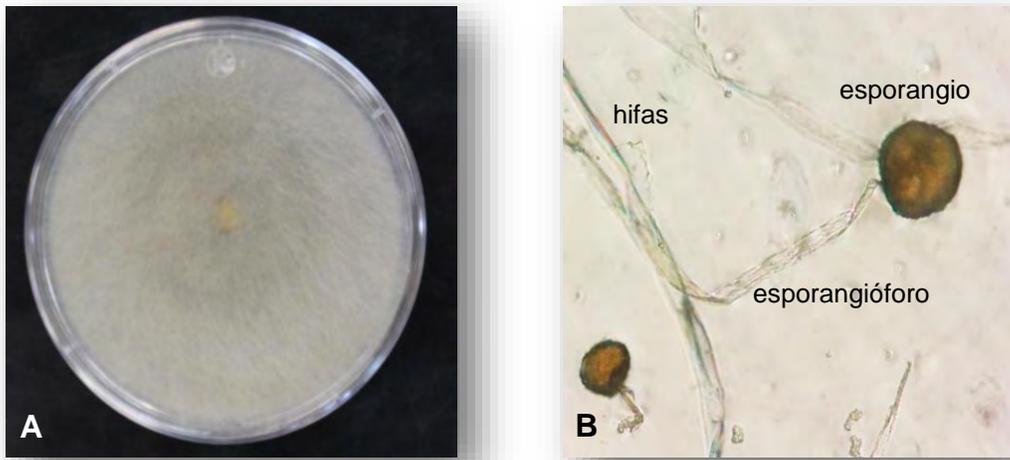


Figura 12. Muestra fúngica etiquetada como A2. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología del micelio observada a 40X.

Características macroscópicas:

Los aislados fúngicos son de color crema grisáceo a amarillo con textura tipo algodonosa laxa. Al reverso son color amarillo. Crecimiento aéreo compuesto de esporangióforos.

Características microscópicas:

El micelio está conformado por hifas gruesas y cenocíticas. Los esporangios son terminales multiesporados, de coloración café, globosos sin apófisis. Los esporangióforos son erectos, hialinos, ramificados sin rizoides.

Género *Alternaria*: B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, C7, C8 y F1

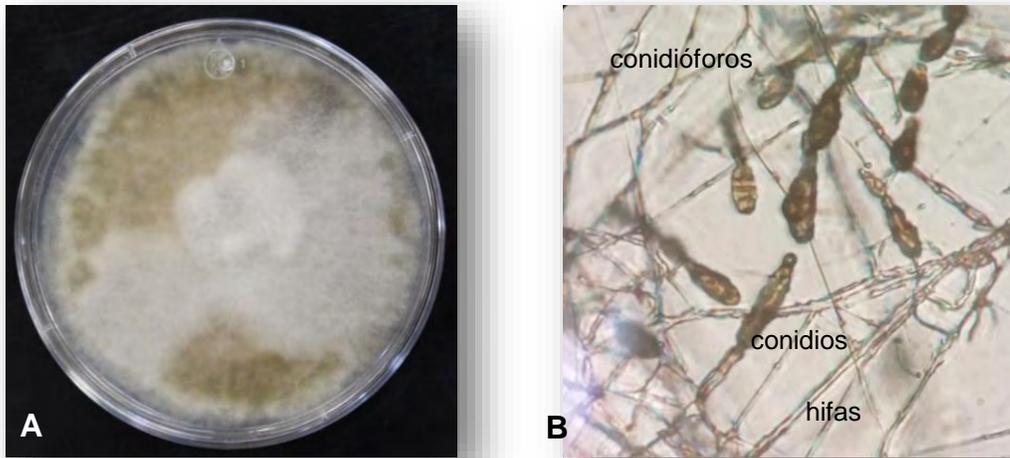


Figura 13. Muestra fúngica etiquetada como B6. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología del micelio observada a 40X.

Características macroscópicas:

Los aislados fúngicos son de color gris y café oliváceo con textura aterciopelada o lanosa. Al reverso son de color café oscuro a negro. Crecimiento superficial. No presenta exudación.

Características microscópicas:

El micelio está conformado por hifas septadas de color café-marrón. Conidióforos son de color marrón, ramificados. Los conidios son de color marrón con septos transversales y longitudinales, forma elipsoide, arreglados en cadenas acrópetas catenuladas.

Género *Peyronellaea*: C6

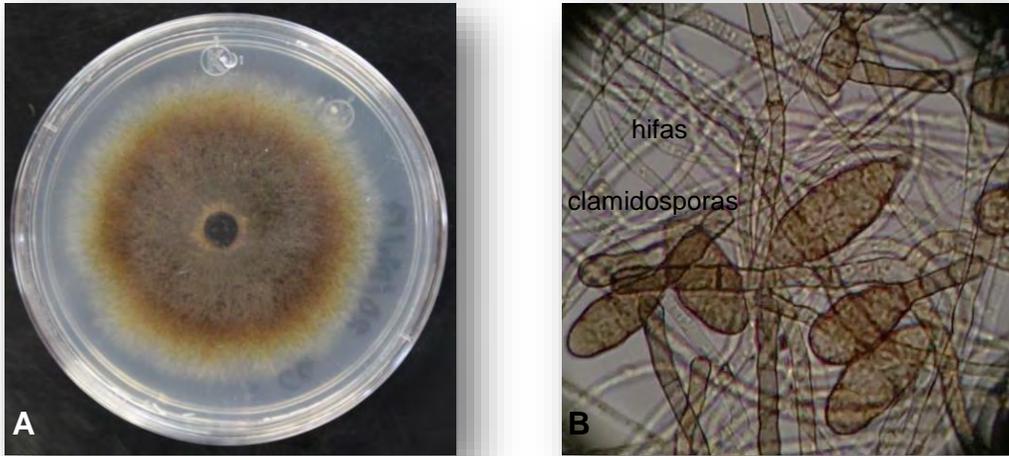


Figura 14. Muestra fúngica etiquetada como C6. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología del micelio observada a 40X.

Características macroscópicas:

Los aislados fúngicos son de tonalidades café oscuro en el centro a pardo conforme continua su crecimiento, con textura aterciopelada, correosa y húmeda. Al reverso son de color café oscuro a negro. Crecimiento superficial.

Características microscópicas:

El micelio está conformado por hifas septadas de color café-marrón. Las clamidosporas se desarrollan de forma aislada en el ápice de la hifa, son de coloración marrón con septos transversales y longitudinales, forma globosa, arregladas de forma individual.

Género *Colletotrichum*: D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8 y D9

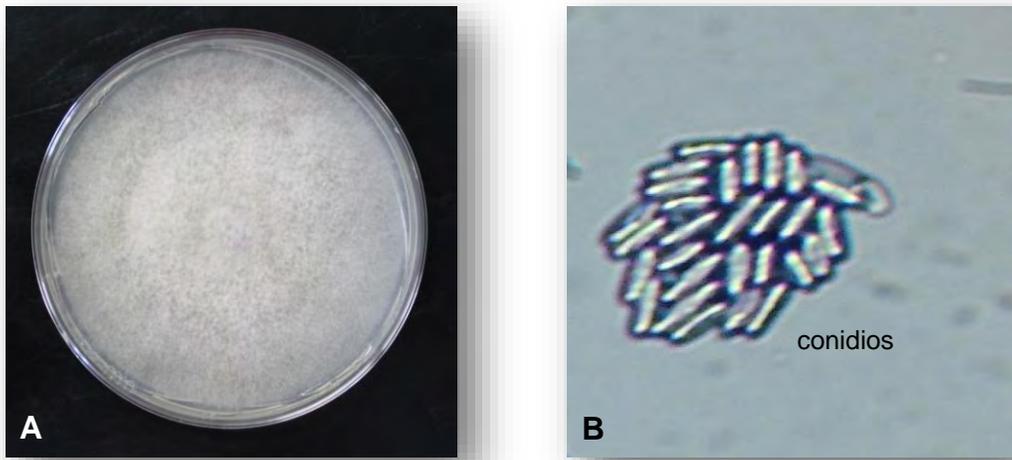


Figura 15. Muestra fúngica etiquetada como D8. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología de los conidios observada a 40X.

Características macroscópicas:

Los aislados fúngicos son color blanco a grisáceo con textura algodonosa densa. Masas conidiales de color naranja brillante cerca del punto de inoculación. Al reverso son de color amarillo crema. Crecimiento aéreo.

Características microscópicas:

El micelio es hialino. Los conidios son hialinos, cilíndricos con extremos redondeados y rectos.

Género *Pestalotiopsis*: E1 y E2

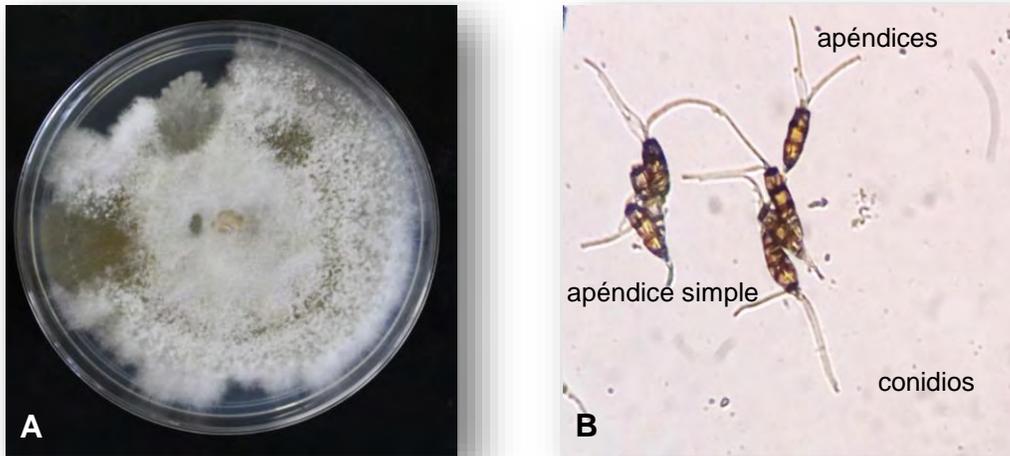


Figura 16. Muestra fúngica etiquetada como E2. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología de los conidios observada a 40X.

Características macroscópicas:

Los aislados fúngicos son de coloración blanquecina con textura algodonosa conforme va madurando. Al reverso son de color blanco a beige. Presentan esporodoquios negros. Crecimiento superficial e irregular.

Características microscópicas:

Los conidios son de forma fusiforme, presentan 4 septos. La célula basal presenta un apéndice simple. La célula apical es cónica y presenta de 1 a 4 apéndices simples. Las células intermedias son de color amarillo a marrón.

Mycelia sterilia: G1 y G2



Figura 17. Muestra fúngica etiquetada como G1. A) Aislado crecido en medio de cultivo PDA después de 15 días a 22°C. B) Morfología del micelio observada a 40X.

Características macroscópicas:

Los aislados fúngicos son de coloración blanquecina con textura algodonosa. Al reverso son de color blanco. Crecimiento superficial .

Características microscópicas:

El micelio está conformado por hifas septadas hialinas. Estructuras reproductivas o de resistencia no observables.

8.2. Identificación molecular de los hongos

Además de la caracterización morfológica, se llevaron a cabo análisis moleculares para confirmar la identidad de los 29 aislados fúngicos obtenidos de la cáscara o pericarpio de los aguacates con sintomatología de roña.

8.2.1. Amplificación por PCR del gen *tef1*

Los pares de *primers* EF1-729F y EF2 amplificaron en la mayoría de las muestras fragmentos de aproximadamente 500 pb, los cuales corresponden a la región del gen *tef1* reportada por Ismail (2013) (Figura 18). Sin embargo, para el caso de las muestras A1, A2 y A3, posiblemente pertenecientes al género *Mucor*, el fragmento obtenido fue de un peso aproximado de 200 pb. Dichas variaciones de tamaño eran una evidencia inicial de que correspondían a diferentes phyla.

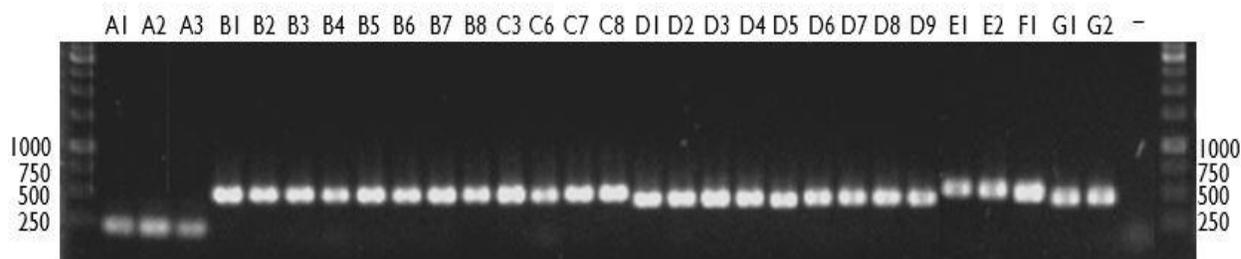


Figura 18. Amplificación por PCR del segmento del gen *tef1* de las 29 muestras de hongos etiquetados de la A1-G2, con el uso de los *primers* EF1-728F (*forward*) y EF2 (*reverse*). En el carril (-) se observa el control negativo. Marcador de peso molecular 1kb en los carriles 1° y 31°.

8.2.2. Agrupación de muestras a través del análisis PCR-RFLPs

El análisis de polimorfismos generado por la digestión del fragmento amplificado del gen *tef1* de las 29 muestras con la enzima *HaeIII* mostró la formación de 6 perfiles diferentes (Figura 19); concordantes con el número de géneros y las muestras fúngicas descritas previamente con base a la caracterización morfológica. Así también estos resultados son concordantes con los patrones obtenidos con la enzima *AluI* (Figura 20). En la Tabla 6 y Tabla 7 del anexo se muestra el tamaño estimado en pares de bases (pb) de los fragmentos obtenidos con el uso de las enzimas *HaeIII*

y *AluI*, respectivamente.

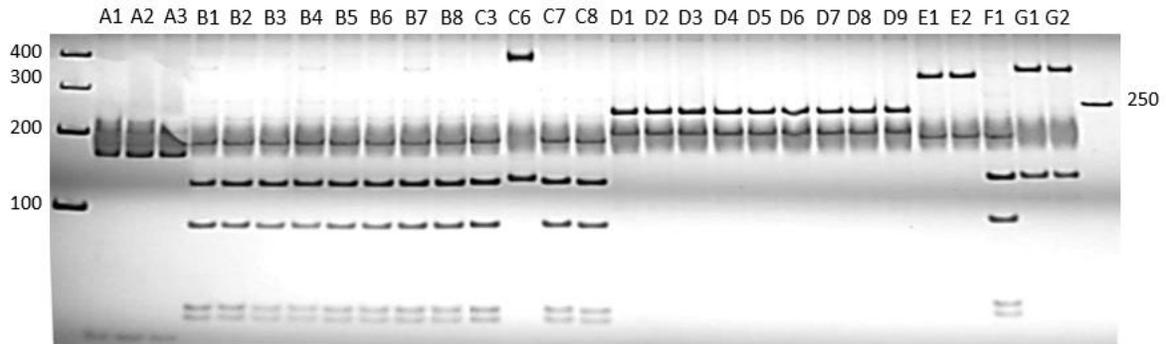


Figura 19. PCR-RFLPs obtenidos de la digestión enzimática del amplificado del gen *tef1* con el uso de la enzima de restricción *HaeIII*. Muestras fúngicas etiquetadas de la A1-G2. Marcadores de peso molecular de 100 pb (1° carril) y 1kb (31° carril).

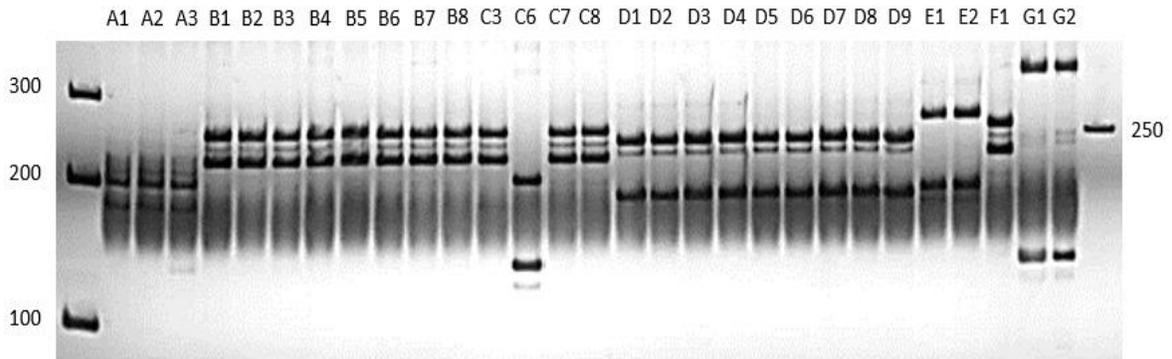


Figura 20. PCR-RFLPs obtenidos de la digestión enzimática del amplificado del gen *tef1* con el uso de la enzima de restricción *AluI*. Muestras fúngicas etiquetadas de la A1-G2. Marcadores de peso molecular de 100 pb (1° carril) y 1kb (31° carril).

Con base al análisis de PCR-RFLPs del fragmento amplificado de *tef1*, la distancia genética estimada utilizando el coeficiente de similitud Nei-Li (1979) / Dice (1945) corroboró una relación genética estrecha entre las muestras.

Considerando valores de 0 de distancia genética entre los aislados fúngicos, en el dendrograma se conformaron 6 clados o grupos, cada uno de ellos constituidos por las mismas muestras anteriormente descritas por la caracterización morfológica (Figura 21).

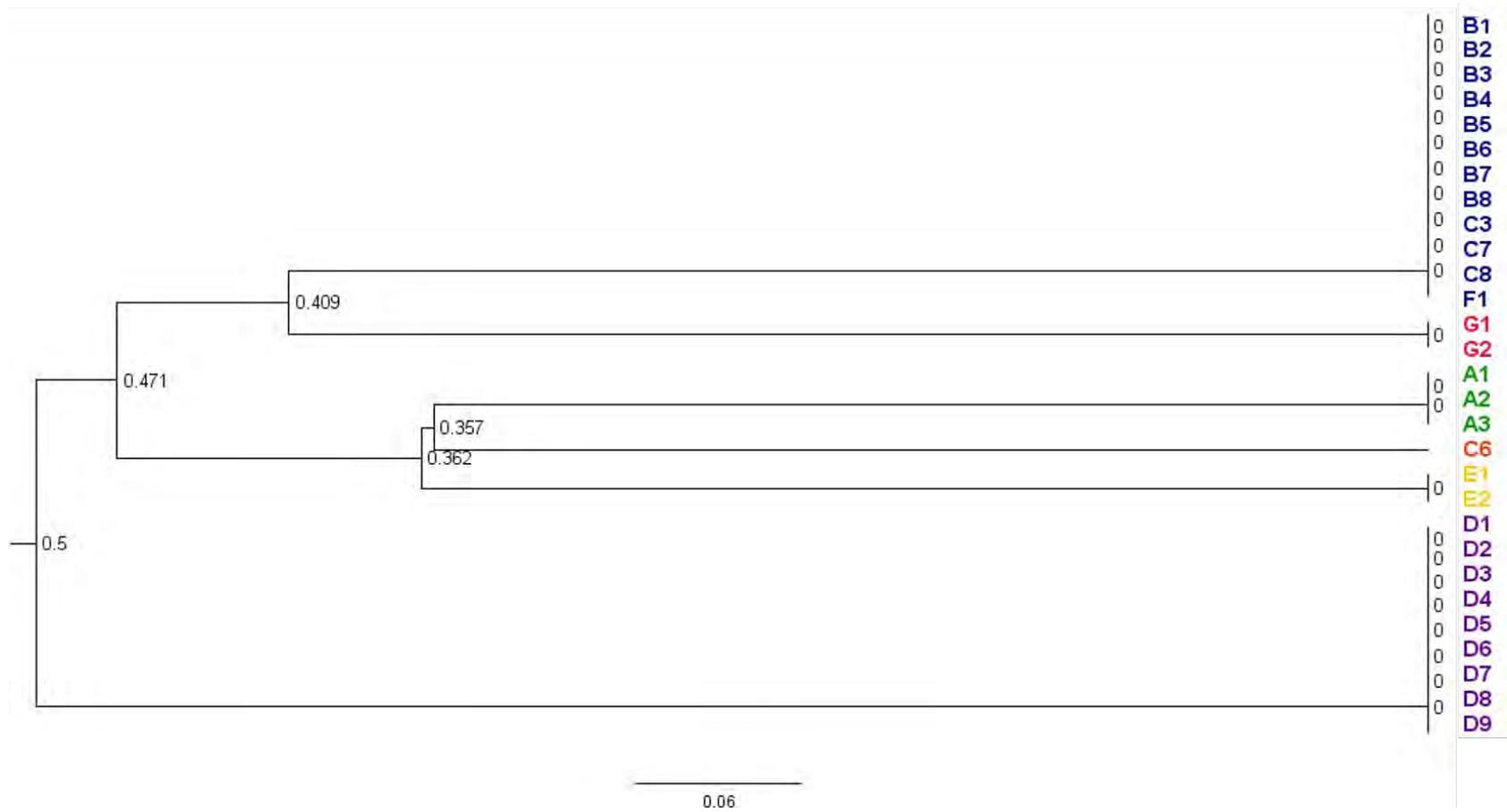


Figura 21. Dendrograma generado a partir de la digestión del fragmento amplificado del gen *tef1* con el uso de las enzimas: *HaeIII* y *AluI*. Construcción basada en el método de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente de Dice (1945) / Nei-Li (1979). El soporte de la topología con un *bootstrap* de 1000 repeticiones. Valores de distancia genética se muestra sobre las ramas.

Con el fin de disminuir el número de muestras a secuenciar; a partir del estudio morfológico y de variación del DNA basado en la distancia genética por PCR-RFLPs, se infiere que los organismos presentes en el mismo clado pertenecen a la misma especie; por lo tanto, las muestras seleccionadas fueron las siguientes: A2, B6, C6, D8, E2 y G1.

8.2.3. Análisis Blast para la identificación molecular

El alineamiento y comparación de los fragmentos de *tef1* (amplificado del par de primers EF1-729F y EF2) con las secuencias curadas y reportadas en la base de datos de GenBank y Q-Bank, se realizó a través del Análisis Blast. En este análisis se hace referencia a la secuencia con el mayor porcentaje de similitud y cobertura (Huang *et al.*, 2009), recomendablemente con valores >95% y >80%, respectivamente (Raja, Miller, Pearce, & Oberlies, 2017). En este estudio la información fue concordante con la identidad a nivel de género propuesta por la caracterización morfológica de la mayoría de los aislamientos fúngicos seleccionados.

La muestra A2 se identificó como *Mucor* sp., coincidente con el análisis Blast de las secuencias, en el que muestra valores del 98% de similitud y 100% de cobertura con *Mucor circinelloides* (HQ845315.1). Por otra parte, para la muestra etiquetada como B6, puesto que se observaron dictioconidios de color marrón con septos transversales y longitudinales, arreglados en cadenas acrópetas, esta se reconoció como *Alternaria* sp., sin embargo, el análisis Blast del gen *tef1* mostró que es 100% idéntica (cobertura del 100%) a la secuencia de *Lasiodiplodia iranensis* (KU997110.1). Asimismo, la muestra C6 se identificó a nivel de género como *Peyronellaea* sp., aunque para el análisis Blast esto no fue concordante debido a que muestra un 94% de similitud y 87% de cobertura con *Phoma medicaginis* (HM157756.1). En el caso de la muestra D8, por sus características morfológicas esta se describió como *Colletotrichum* sp., coincidente con la secuencia de *Colletotrichum* sp (GU994302.1), al compartir un nivel de identidad del 99% y 100% de cobertura. Referente a la muestra E2, esta se identificó como *Pestalotiopsis* sp., debido a que presenta

conidios de forma fusiforme y con 4 septos, en el análisis de Blast, es 100% idéntica (cobertura del 100%) a *Pestalotiopsis* sp (LC184193.1). La muestra G1 al no presentar estructuras reproductivas, se catalogó como *Mycelia sterilia*; posteriormente, tomando como referencia el gen *tef1* en el análisis de Blast se identificó como similar de *Arthrimum phragmites* (KF145043.1) con un 86% de identidad y 78% de cobertura (Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización morfológica y análisis Blast con las secuencias reportadas en GenBank y Q-Bank con el mayor porcentaje de similitud y cobertura.

Caracterización morfológica		Análisis Blast				
Muestra	Especie	Especie	No. de acceso	% de similitud	% de cobertura	Procedencia
A2	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor circinelloides</i>	HQ845315.1	98	100	Cutánea humana (<i>Homo sapiens</i>), EUA
B6	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Lasiodiplodia iranensis</i>	KU997110.1	100	100	Hojas de marula (<i>Sclerocarya birrea</i>), Sudáfrica
C6	<i>Peyronellaea</i> sp	<i>Phoma medicaginis</i>	HM157756.1	94	87	Tallo de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), EUA
D8	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	GU994302.1	99	100	Hojas de aguacate, (<i>Persea americana</i>), Panamá
E2	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	LC184193.1	100	100	Hojas de azucena (<i>Lilium</i> sp.), Japón
G1	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Arthrinium phragmites</i>	KF145043.1	86	78	Tallo de Phragmites (<i>Phragmites australis</i>) Italia

8.2.4. Análisis filogenético con el gen *tef1*

Para tener mayor confiabilidad y soporte en la identificación de los aislados fúngicos se realizaron análisis filogenéticos con base en el fragmento amplificado de las secuencias del gen *tef1* utilizando el algoritmo de Máxima Verosimilitud y valores de robustez o *bootstrap* superiores al 70% (Mirhendi *et al.*, 2014; Nozawa, *et al.*, 2016; Kaplan *et al.*, 2018).

Tomando en consideración la clasificación filogenética actualizada por Hibbett *et al.* (2007), las 46 secuencias obtenidas de la base de datos pertenecen a los phylum Ascomycota y Mucoromycota. Con ello, dentro del primer phylum mencionado, se generaron 3 árboles filogenéticos separados en subclases: Pleosporomycetidae, Hypocreomycetidae, Xylariomycetidae; y en Mucoromycota se generó un árbol que incluye especies del orden Mucorales. Cada árbol fue enraizado con la especie *Saccharomyces cerevisiae*, debido a la relación filogenética distante.

En la mayoría de los aislamientos fue posible realizar la identificación molecular a nivel de subclase, orden, familia o género. Sin embargo, para ningún caso se logró confirmar la hipótesis de identidad a nivel de especie.

Para el caso del árbol filogenético conformado por especies pertenecientes al orden Mucorales, se forma un clado de bajo soporte, con valor de robustez del 45%; en el que se agrupa el aislado fúngico etiquetado como A2 junto con: *Mucor flavus*, *Mucor circinelloides*; y *Amylomyces rouxii*. Es de destacar la baja resolución, puesto que otros taxones del mismo género como: *Mucor racemosus* y *Mucor spinosus* (reenombrado a *Mucor plumbeus*) no se agrupan en el clado antes mencionado. De igual manera *Ellisomyces anomalus* y *Backusella ctenidia* pertenecientes a la familia Thamniaceae no pertenecen al mismo grupo o clado; por lo tanto la resolución alcanzada es a nivel de orden (Figura 22).

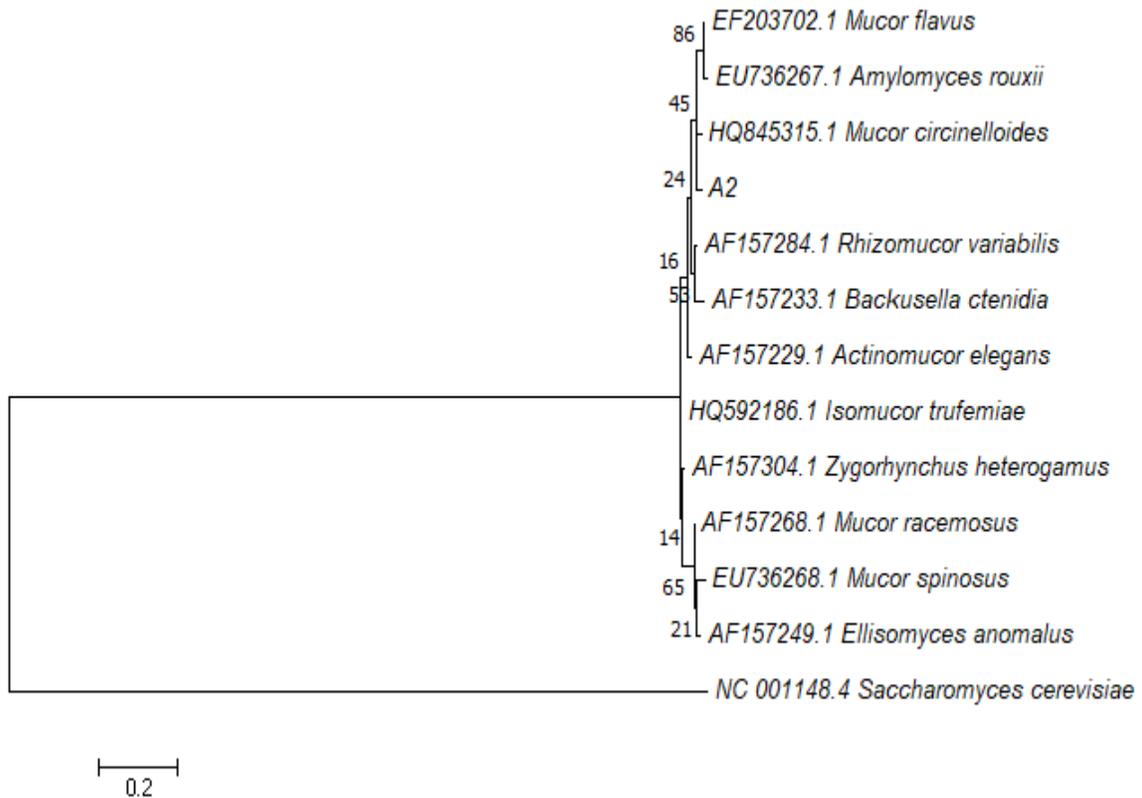


Figura 22. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima Verosimilitud obtenido del alineamiento de 12 secuencias de nucleótidos del gen *tef1* (Orden Mucorales). Modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros con una distribución discreta de Gamma (K2+G). Valores de *bootstrap* con 1000 repeticiones se muestran sobre las ramas. Grupo externo *Saccharomyces cerevisiae*.

Por otra parte, en el árbol filogenético que incluye a la subclase Pleosporomycetidae, se formó un clado con soporte alto, mostrando un valor de robustez del 85% que incluye taxones identificados como *Alternaria tenuissima*, *Alternaria alternata*, *Stemphylium lycopersici*, pertenecientes al orden Pleosporales y *Lasiodiplodia iranensis*, taxón del orden Botryosphaerales. Este clado incluyó el aislamiento etiquetado como B6. Sin embargo, por lo antes mencionado no proporcionó suficiente resolución para definir taxones a niveles inferiores a subclase. Asimismo, se formó un clado con un valor de *bootstrap* del 96%, en el que se incluyeron taxones del género *Peyronellaea*, junto con la muestra C6, con lo cual la resolución para este grupo de taxones se obtuvo a nivel de género (Figura 23).

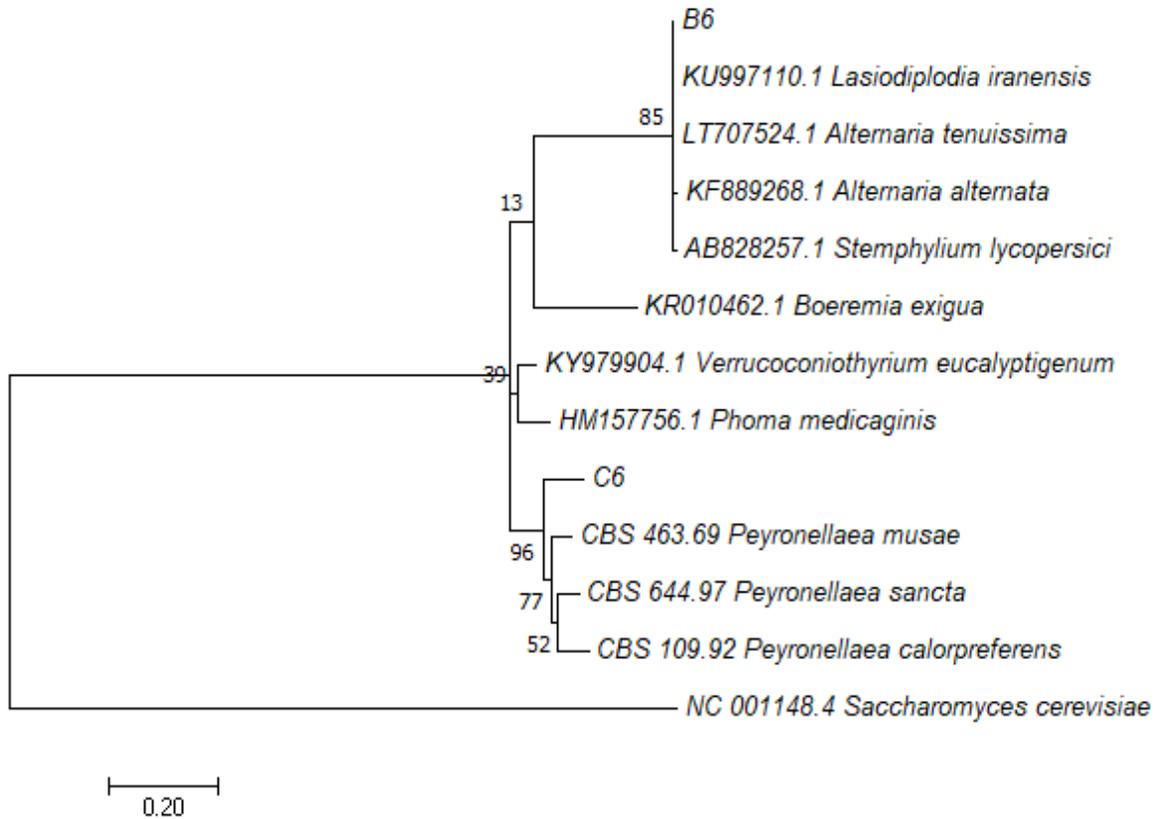


Figura 23. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima Verosimilitud obtenido del alineamiento de 12 secuencias de nucleótidos del gen *tef1* (Subclase Pleosporomycetidae). Modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros con una distribución discreta de Gamma (K2+G). Valores de *bootstrap* con 1000 repeticiones se muestran sobre las ramas. Grupo externo *Saccharomyces cerevisiae*.

Con respecto al árbol filogenético de la subclase Hypocreomycetidae, este se encuentra conformado por taxones identificados únicamente en el género *Colletotrichum*, el cual muestra valores de robustez del 68% al 98%, esto a pesar de contar con un bajo número de secuencias por comparar. En este caso la muestra D8 es verificada a nivel de género como *Colletotrichum*, debido a que conforma un clado con un soporte de 76% de *bootstrap* con *Colletotrichum* sp. (Figura 24).

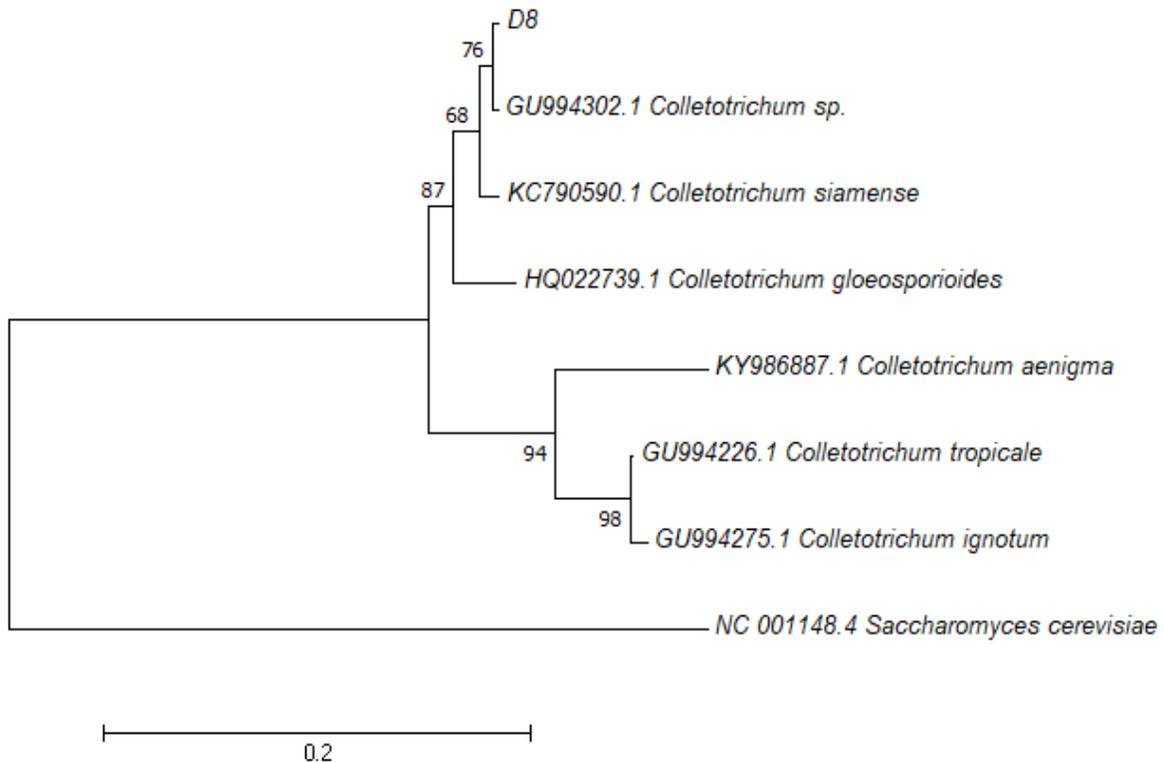


Figura 24. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima Verosimilitud obtenido del alineamiento de 7 secuencias de nucleótidos del gen *tef1* (Subclase Hypocreomycetidae). Modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros con una distribución discreta de Gamma (K2+G). Valores de *bootstrap* con 1000 repeticiones se muestran sobre las ramas. Grupo externo *Saccharomyces cerevisiae*.

Por lo que se refiere al árbol filogenético de la subclase Xylariomycetidae se mostró como se forman 2 clados con soporte alto, en los cuales se observan valores de robustez del 99% para taxones pertenecientes a la familia Pestalotiopsidaceae y del 77% para el clado hermano con taxones de la familia Apiosporaceae. La muestra etiquetada como E2 junto con el taxón identificado como *Pestalotiopsis crassiuccula* forman un grupo con el 46% de robustez, sin embargo, considerando a *Neopestalotiopsis* sp., se constituye el clado con un valor de robustez del 90%, por lo tanto, la resolución es a nivel de familia. Finalmente, en relación con la muestra etiquetada como G1, se identifica a nivel de género como *Arthrimum* ya formó un clado con soporte alto (Figura 25).

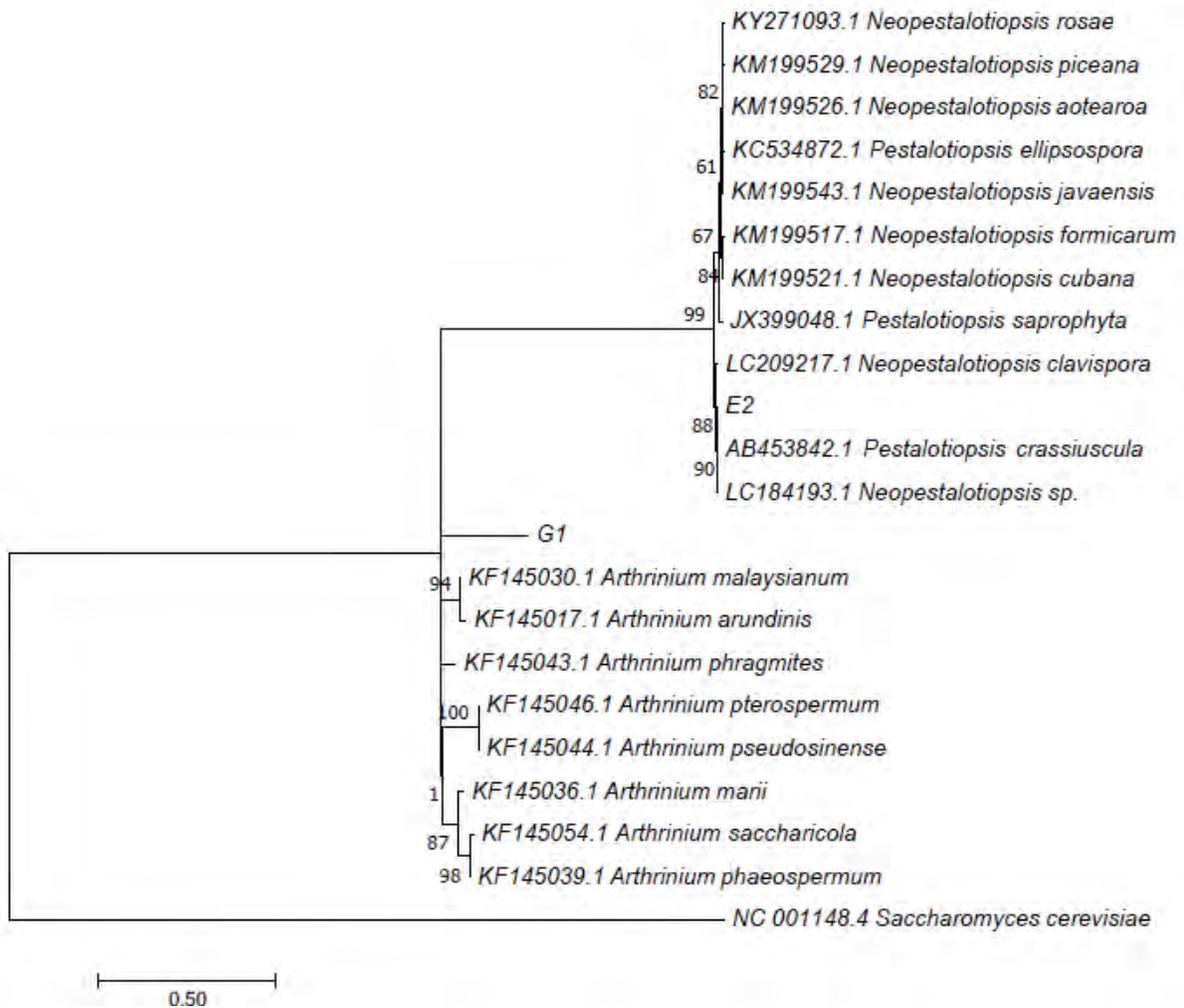


Figura 25. Árbol filogenético basado en el algoritmo de Máxima Verosimilitud obtenido del alineamiento de 21 secuencias de nucleótidos del gen *tef1* (Subclase Xylariomycetidae). Modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2 parámetros con una distribución discreta de Gamma (K2+G). Valores de *bootstrap* con 1000 repeticiones se muestran sobre las ramas. Grupo externo *Saccharomyces cerevisiae*.

9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Jenkins (1934) reporta a *S. perseae*, hoy en día renombrado como *E. perseae*, único agente causal de la roña en aguacate. Sin embargo, los resultados de este estudio fueron contrastantes, debido a que no se aisló dicho hongo fitopatógeno. Lo obtenido, es información parcialmente coincidente con el estudio realizado por Everett *et al.* (2011) en aguacates de Nueva Zelanda, donde a través de técnicas morfológicas, moleculares y de patogenicidad reportaron la ausencia de *E. perseae* como hongo asociado al tejido sintomático catalogado como roña.

A manera de desglose, con respecto a la caracterización morfológica de la roña; es importante mencionar que sí se presentaron los síntomas típicos en las muestras de aguacate, tales como: lesiones corchosas de color marrón que cubren el pericarpio del fruto (Jenkins, 1934, Burnett, 1974; Palmateer, 2006), y manchones rojizos que posteriormente ocasionan la formación de perforaciones en hojas y tallo (Pernezny & Marlatt 2007). Sin embargo, en lo que se refiere a las descripciones de cultivos en medio PDA mantenidos a condiciones similares, ninguno de los aislados de hongos obtenidos fue coincidente con *E. perseae*, debido a que no se lograron identificar características como un crecimiento lento, colonias convuladas de color beige (Palmateer, 2006; Everett, 2008) y conidios hialinos, con forma ovoide a oblongoelipsoide (Jenkins, 1934).

Los resultados obtenidos de las técnicas moleculares en donde destaca el análisis Blast y filogenético de los fragmentos amplificados del gen *tef1* de los seis aislados seleccionados (A2, B6, C6, D8, E2 y G1) por la técnica de PCR-RFLPs, demostraron que ninguna de estas secuencias era similar a las de los taxones previamente identificados como *E. perseae* o con especies relacionadas, pertenecientes al mismo género como: *E. fawcettii*, *E. australis*, *E. canavaliae* y *E. phaseoli* y *E. ampelina* (Jenkins 1925; Shear 1929; Jenkins 1931; Bruner & Jenkins 1933; Bitancourt & Jenkins 1936; Boedijn 1961; Tan *et al.*, 1996) agentes causales de la enfermedad de la roña en diversos frutos.

Swart *et al.* (2001), Hyun *et al.* (2009), Everett *et al.* (2011), Fan *et al.* (2017), entre otros, han empleado primordialmente el gen ITS, por lo que el gen *tef1* aún no está bien representado en la base de datos del GenBank y Q-Bank, lo que ocasiona errores en la identificación de taxones. Por lo tanto, es necesario confirmar estos resultados mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS y la subregión del mismo con los *primers* específicos SpF5 / R6 para la especie *E. perseae*, diseñados por Everett *et al.* 2011.

Asimismo, se logró obtener 29 aislamientos fúngicos asociados al tejido sintomático de aguacates colectados, de los cuales con el análisis PCR-RFLPs se conformaron 6 clados diferentes y se eligió una muestra de cada uno de ellos (A2, B6, C6, D8, E2 y G1). La selección de cada hongo con base en los perfiles genéticos y distancias genéticas con valor de 0 fue concordante con la caracterización morfológica previamente realizada en donde se identificaron 6 géneros diferentes: *Mucor*, *Alternaria*, *Peyronellaea*, *Colletotrichum* y *Pestalotiopsis*. Exceptuando el aislamiento etiquetado como G1, el cual fue catalogado como *Mycelia sterilia*, debido a la ausencia de estructuras reproductivas en el medio de cultivo (Lacap *et al.*, 2003). De manera tal, el análisis de PCR-RFLPs con el gen *tef1* tuvo el suficiente grado de polimorfismo para diferenciar las muestras según las distancias genéticas entre ellas y seleccionar una de cada clado para secuenciación. Sin embargo, el dendrograma generado no representó relación filogenética entre ellos. Posiblemente, tal como lo mencionan (Crous, Hawksworth, & Wingfield, 2015) una de las desventajas que se le atribuyen a los RFLPs es su falta de claridad en los perfiles debido a que se desconoce si por cada muestra, los fragmentos generados se equiparan a las mismas regiones del gen, ya que cada fragmento puede representar una región diferente, pero con el mismo peso molecular. Así también (Curran & Webster, 1989) señalan que las diferencias en los perfiles polimórficos no pueden ser usadas como criterio único para delimitar una especie. Por lo tanto, para corroborar esta información e identificar los aislados a nivel de especie, se realizó la técnica de secuenciación para posteriormente llevar a cabo el análisis filogenético.

En general, hubo concordancia con los caracteres morfológicos y las secuencias

tef1. Con base en la secuenciación y análisis filogenético de la región amplificada por los *primers* EF1-728 y EF2, se logró la identificación taxonómica a nivel de subclase, orden, familia, o hasta género, en algunos casos, de la diversidad de hongos asociados a la sintomatología de la roña en aguacate.

Dentro de los hongos identificados a través del análisis filogenético se incluye el orden Mucorales, donde el género posible al que pertenece la muestra A2 y por ende A1 y A3, según el análisis morfológico es *Mucor*. Estudios previos confirman que este género es patógeno de plantas, las cuales pueden producir pudrición blanda en diferentes frutos y vegetales tanto en cultivo como en postcosecha (Agris, 2005; White *et al.*, 2006; Alvarez *et al.*, 2009). Además, estos resultados concuerdan con lo reportado por Wogu, 2014, donde menciona la presencia de hongos correspondientes al género *Mucor* en frutos de aguacate cosechados que se encuentran en proceso de deterioro.

Los resultados arrojados en la caracterización morfológica sugieren que las muestras B6 y por ende B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8 y F1, corresponden al género *Alternaria*. Sin embargo, en lo que respecta al análisis Blast de las secuencias; con un porcentaje de similitud del 100% y cobertura del 100% la muestra se identificó como *Lasiodiplodia iranensis*, resultados no concordantes con lo obtenido en los aislados, puesto que, a nivel morfológico *L.iranensis*, se caracteriza por presentar células conidiógenas a partir de las cuales se desarrollan los conidios. Dichos conidios en fase madura se observan con coloración café pardo, elipsoide con estrías y un septo. A nivel macroscópico se desarrollan colonias aéreas (Phillips *et al.*, 2013) y hasta el momento únicamente se tiene reportado como huesped en especies como *Citrus* sp. (cítricos), *Eucalyptus* sp. (eucalipto), *Juglans* sp. (nogal), *Mangifera indica* (mango), *Salvadora pérsica* (árbol de la mostaza), y *Terminalia catappa* (almendro malabar) (Abdollahzadeh, Javadi, Mohammadi Goltapeh, Zare, & Phillips, 2010). Por otro lado, a través del análisis filogenético se conformó únicamente un clado con soporte alto, el cual agrupa a los taxones identificados con el género *Alternaria* y *Lasiodiplodia*. En consecuencia, a pesar de no contar con la suficiente resolución en género y se infiera a nivel de orden, existe mayor evidencia de que se trate de *Alternaria*. Cepero

(2012) en conjunto con Filtenborg *et al.* (1996) referencian a las especies pertenecientes al último género mencionado como patógenos de plantas y los principales causantes de las alteraciones más frecuentes en frutas y hortalizas, especialmente al aspecto físico. En correspondencia con estudios previos en aguacate, Smilanick (2002) y Pérez-Jiménez (2008) encontraron organismos del género *Alternaria* como uno de los agentes causales de la podredumbre en el fruto, corroborando de esta manera su patogenicidad.

A través del análisis Blast, la secuencia C6 mostró un porcentaje de similitud del 94% y cobertura del 87% con respecto a *Phoma medicaginis*. Sin embargo, a nivel filogenético, el género al que se hace referencia es *Peyronellaea*, debido a que muestra un valor de *bootstrap* alto en el clado conformado por la muestra junto con las 3 secuencias del mismo género. En lo que se refiere al estudio morfológico, debido a que el aislado presentó clamidosporas segmentadas, característica determinante, se confirma su identidad a nivel general (Boerema *et al.*, 2004). Estudios moleculares donde se utiliza la región ITS y parte del gen de la β -tubulina (Aveskamp *et al.*, 2009) cuentan con la resolución de poder diferenciar entre ambos géneros con mayor certeza. En la actualidad no existen investigaciones referidas a la presencia de hongos del género *Peyronellaea* en aguacate. Sin embargo, éste se ha encontrado asociado como patógeno en *Pisum sativum* (chícharo) (Davidson *et al.*, 2009), *Mangifera indica* (mango), *Zea mays* (maíz), *Coffea arabica* (cafeto arábigo) (Aveskamp, de Gruyter, Woudenberg, Verkley, & Crous, 2010) entre otros.

Por el contrario, la muestra D8 se identificó a nivel de género como *Colletotrichum* sp. Tanto el análisis morfológico, Blast y filogenético utilizando parte de la secuencia del gen *tef1* coincidieron en los resultados estudiados. Es de mencionar que a pesar de contar con un bajo número de secuencias, los valores de robustez fueron altos (68% al 98%), lo que lo hace un buen marcador molecular genérico. Hasta el momento no existe información que relacione a *Colletotrichum* con la enfermedad de la roña. Sin embargo, la antracnosis en aguacate es una enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum boninense*, que afecta gravemente la producción (Silva-Rojas & Ávila-Quezada,

2011). Además, recientemente se ha identificado como nuevo agente causal a *Colletotrichum godetiae*. Los síntomas observados en los frutos incluyen manchas marrón-negras en el exocarpo y pudrición blanda en el mesocarpo, independientemente de la especie de *Colletotrichum* aislada (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015).

Otro de los hongos identificados fue el perteneciente a la familia Pestalotiopsisaceae. Los resultados del análisis Blast y morfológico, fueron concordantes a nivel de género puesto que a través del primero antes mencionado, se mostró un 100% de similitud de la muestra E2 con *Pestalotiopsis sp.*, aunado que al considerar características morfológicas, principalmente el número de las células de los conidios y la coloración de las células medias (S.S.N. Maharachchikumbura, Hyde, Groenewald, Xu, & Crous, 2014), dicha identidad se corroboró. Anteriormente se evaluó la estabilidad de estos caracteres utilizando filogenias moleculares (Jeewon, Liew, Simpson, John Hodgkiss, & Hyde, 2003; Liu *et al.*, 2010), lo que demostraron que la pigmentación de las células medias es un carácter útil y estable, pero con ciertas restricciones. Sin embargo, con base en el análisis filogenético y con valores de robustez altos del 90%, la resolución únicamente del marcador molecular *tef1* es a nivel de familia ya que dentro del clado se encuentra agrupado *Neopestalotiopsis sp.* Con base en su patogenicidad, se tiene reportado que las especies del género *Pestalotiopsis* son fitopatógenos comunes que causan una variedad de enfermedades, incluyendo lesiones de cancro, manchas foliares, tizón, pudrición de la fruta y varias enfermedades postcosecha (Sajeewa S. N. Maharachchikumbura, Zhang, Wang, & Hyde, 2013) en manzana, arándano, coco, castaña, jengibre, vid, guayaba, avellana, lichi, mango, orquídea, melocotón y rambután (Sun & Cao 1990; Sangchote *et al.*, 1998; Xu *et al.* 1999; Keith *et al.*, 2006; Joshi *et al.*, 2009; Keith y Zee 2010; Chen *et al.*, 2011; Evidente *et al.*, 2012; Maharachchikumbura *et al.*, 2013; Ren *et al.* 2013). De igual modo, especies del género *Neopestalotiopsis*, como: *Neopestalotiopsis australis*, *N. honoluluana*, *N. protearum* y *N. zimbabweana*, se registran como fitopatógenos en plantas de la familia Proteaceae. Hasta el momento en aguacate, únicamente se cuenta con el reporte de *P. clavispora* como agente fitopatógeno y causal de pudrición de tallo (Valencia, Torres, & Latorre, 2011).

Con base en el análisis de DNA, los problemas asociados a la identificación taxonómica de hongos catalogados como *Mycelia sterilia* son resueltos. Tal es el caso de este estudio donde la muestra representante G1 se identificó como *Arthrinium phragmites* con un 86% de similitud y cobertura del 78%, aunque a nivel filogenético se mostró la falta de resolución del marcador a nivel de especie, alcanzando así el grado jerárquico de género. Investigaciones como las de Guo, Hyde, & Liew, 2001 y Lacap *et al.* (2003) confirman estos resultados. En general el género *Arthrinium* está muy extendido y es ecológicamente diverso. Comúnmente se le encuentra como saprobio en pastos, así como también en hojas, tallos y raíces en diferentes plantas (Agut & Calvo, 2004). Por otra parte, se ha reportado como un patógeno de plantas, con *A. arundinis* causando el tizón del grano de cebada (Cano, 1992), y *A. sacchari* en la humectación del trigo (Mavragani, Abdellatif, McConkey, Hamel, & Vujanovic, 2007) y como un endófito en el tejido de la planta (Ramos *et al.* 2010). Para el caso de aguacate, los resultados fueron consistentes con la investigación de Thomas, Eicker, & Robbertse (1994) debido a que fue posible su aislamiento e identificación.

Se sabe que la región espaciadora interna transcrita (ITS) del DNA ribosomal, es el marcador molecular más útil para la identificación a nivel de especies y por ende es catalogado como el código de barras fúngico oficial (Schoch *et al.*, 2012). Esto debido a que es lo suficientemente variable para distinguir inter e intraespecies (*barcode gap*), además de su naturaleza multicopia en los genomas que le confiere la facilidad de amplificación. Sin embargo, dependiendo del grupo de hongos, otros genes proporcionan una mejor resolución a nivel de especie (Gazis, Rehner, & Chaverri, 2011).

Así, por ejemplo, estudios con grupos de hongos fitopatógenos (Roger, Sandblom, Doolittle, & Philippe, 1999), entre los que destacan los pertenecientes a los géneros *Fusarium* (Geiser *et al.*, 2004), *Trichoderma* (Druzhinina *et al.*, 2005), *Diaporthe* (Santos *et al.*, 2010; Udayanga *et al.*, 2012), el uso del gen *tef1* como marcador molecular, confiere una mejor resolución y soporte en la identificación a nivel de especie, ya que codifica para una proteína ubicua, conservada; con propiedades

idóneas para la inferencia de relaciones filogenética (Roger *et al.*, 1999) y se cuentan con única copia del gen dentro del genoma (Baldauf & Doolittle, 1997). Además, se ha demostrado que es un gen útil (Druzhinina & Kubicek, 2005) ya que los intrones son altamente variables, y sólo pueden alinearse de forma fiable entre los miembros de un complejo de especies, o entre varias estrechamente relacionados; razón por la cual se realizaron cuatro arboles filogenéticos diferentes (Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2015).

Sin embargo, es de mencionar que el uso del gen *tef1*, como único marcador de DNA, tuvo sus limitaciones en el análisis filogenético para la identificación de hongos aislados del tejido sintomático, debido a que a pesar de que se amplificaron regiones informativas, principalmente el intrón largo; reportada como la región con mayor variabilidad (O'Donnell *et al.*, 1998), esta no tuvo la suficiente resolución a nivel de especie para discernir a que taxón pertenecen, dando así un alcance en este estudio a nivel supraespecífico.

Así también, el escaso número de accesos registrados con los que cuentan las bases de datos de Genbank y Q-Bank, de las cuales la segunda mencionada es la única base curada con secuencias de *tef1* de la mayoría de hongos registrados a nivel mundial, imposibilita la identificación y clasificación de los taxones debido al bajo número de secuencias por comparar.

Por ende, es necesario corroborar dichos resultados a través de análisis multigénicos donde se consideren un mayor número de marcadores genéticos y esté integrada la región ITS.

10. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 29 aislados fúngicos asociados a la sintomatología de roña en el pericarpio del aguacate; en donde dada la caracterización morfológica de cada una de ellas, ninguna fue identificada como *E. perseae*.
- Con base en el soporte mostrado a través del análisis filogenético, las muestras se lograron clasificar hasta niveles supraespecíficos diferentes. Estos son pertenecientes a los géneros (*Peyronellaea*, *Colletothricum* y *Arthrinium*), familia (Pestalotiopsidaceae), orden (Mucorales), y subclase (Pleosporomycetidae).
- En ningún caso se confirmó la identidad a nivel de especie de los hongos aislados. Esto debido a la resolución proporcionada por el marcador *tef1*, el cual varía dependiendo del grupo de hongos a identificar. Por lo tanto, es necesario realizar protocolos de investigación integral que conjunten información morfológica, patológica y molecular, para definir con mayor certeza la identidad de los hongos
- La caracterización morfológica de la mayoría de los aislados coincidió con la información depositada en GenBank y Q-Bank para la identificación de hongos. Sin embargo, es necesario ampliar el bagaje de la base de datos referente a las secuencias del gen *tef1*, con el fin de poder realizar un análisis comparativo más amplio y certero.
- Los marcadores moleculares son de gran utilidad para la identificación de hongos denominados *Mycelia sterilia*, los cuales presentan nula esporulación en condiciones ambientales estándar, como el caso del género *Arthrinium* el cual necesita de luz UV constante.

11. PERSPECTIVAS

Con base en la clasificación filogenética molecular de Hibbett *et al.* (2007), este estudio da a conocer de manera general el nombre de las subclases, órdenes, familias o hasta géneros de hongos que se encuentran asociados al pericarpio del aguacate con sintomatología de roña. Sin embargo, estos resultados deben de compararse con la clasificación taxonómica reciente, propuesta por Tedersoo *et al.*, (2018) debido a posibles actualizaciones realizadas.

Así también, es necesario contrastar los resultados obtenidos con información proporcionada con la región ITS y análisis multigénicos, con el fin de obtener mejor resolución para la identificación de los hongos a nivel de especie.

De manera particular, este trabajo experimental se propone como parteaguas para el desarrollo de posteriores pruebas de patogenicidad que permitan evaluar el efecto de dichos hongos sobre el fruto del aguacate. Por lo tanto, la investigación en ciencias básicas, como lo es la rama de la biología molecular, en la actualidad funge como un sustento que provee conocimiento en pro de la agricultura y la economía nacional.

12. ANEXOS

Tabla 3. Reactivos y volumen utilizados en la reacción de PCR para la amplificación del gen *tef1*

Reactivo	Concentración de stock	Concentración final	Volumen final x 1 reacción (en μL)
GoTaq® Buffer	5x	1x	5
Primer forward	100 μM	4 μM	1
Primer reverse	100 μM	4 μM	1
dNTPs	1 mM	200 μM	5
MgCl ₂	50 mM	5 mM	2.5
GoTaq® DNA Polimerasa	5 U/ μL	1.5 U/ μL	0.3
Agua HPLC	-	-	8.2
DNA	20ng/ μL	40ng/ μL	2
Total			25

Tabla 4. Reactivos empleados para la realización del gel de acrilamida al 8%.

Reactivo	Volumen para 1 placa
Acrilamida 30%	13 mL
Agua destilada	35 mL
TBE 5X	12 mL
APS %	420 μL
TEMED	35 μL
Total	60.455 mL

Tabla 5. Número de acceso y nombre científico de las secuencias utilizadas en el estudio.

No. de accesoión	Especie
AF157229.1	<i>Actinomucor elegans</i>
KF889268.1	<i>Alternaria alternata</i>
EU736267.1	<i>Amylomyces rouxii</i>
KF145017.1	<i>Arthrinium arundinis</i>
KF145030.1	<i>Arthrinium malaysianum</i>
KF145036.1	<i>Arthrinium marii</i>
KF145043.1	<i>Arthrinium phragmites</i>
KF145039.1	<i>Arthrinium phaeospermum</i>
KF145044.1	<i>Arthrinium pseudosinense</i>
KF145046.1	<i>Arthrinium pterospermum</i>
KF145054.1	<i>Arthrinium saccharicola</i>
AF157233.1	<i>Backusella ctenidia</i>
KR010462.1	<i>Boeremia exigua</i>
KX938398.1	<i>Cladosporium tianshanense</i>
KY986887.1	<i>Colletotrichum aenigma</i>
HQ022739.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
GU994275.1	<i>Colletotrichum ignotum</i>
KC790590.1	<i>Colletotrichum siamense</i>
GU994302.1	<i>Colletotrichum sp.</i>
GU994226.1	<i>Colletotrichum tropicale</i>
AF157249.1	<i>Ellisomyces anomalus</i>
HQ592186.1	<i>Isomucor trufemiae</i>
KU997110.1	<i>Lasiodiplodia iranensis</i>
HQ845315.1	<i>Mucor circinelloides</i>
EF203702.1	<i>Mucor flavus</i>
AF157268.1	<i>Mucor racemosus</i>
EU736268.1	<i>Mucor spinosus</i>
KM199526.1	<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>
LC209217.1	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>
KM199521.1	<i>Neopestalotiopsis cubana</i>
KM199517.1	<i>Neopestalotiopsis formicarum</i>
KM199543.1	<i>Neopestalotiopsis javaensis</i>
KM199529.1	<i>Neopestalotiopsis piceana</i>
KY271093.1	<i>Neopestalotiopsis rosae</i>
LC184193.1	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>
AB453842.1	<i>Pestalotiopsis crassiuscula</i>
KC534872.1	<i>Pestalotiopsis ellipsospora</i>
JX399048.1	<i>Pestalotiopsis saprophyta</i>
CBS 109.92	<i>Peyronellaea calorpreferens</i>
CBS 463.69	<i>Peyronellaea musae</i>
CBS 644.97	<i>Peyronellaea sancta</i>
HM157756.1	<i>Phoma medicaginis</i>
AF157284.1	<i>Rhizomucor variabilis</i>
AB828257.1	<i>Stemphylium lycopersici</i>
KY979904.1	<i>Verrucoconiothyrium eucalyptigenum</i>
AF157304.1	<i>Zygorhynchus heterogamus</i>

Tabla 6. Tamaño estimado en pares de bases (pb) de los fragmentos generados por la enzima *HaeIII*.

Muestra	Tamaño aproximado de fragmentos (pb)					Total
A1, A2, A3	10	180				190
BI, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, C3, C7, C8, F1	20	30	80	140	190	460
C6	140	400				540
D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9	200	240				440
E1, E2	190	350				540
G1, G2	140	370				510

Tabla 7. Tamaño estimado en pares de bases (pb) de los fragmentos generados por la enzima *AclI*

Muestra	Tamaño aproximado de fragmentos (pb)		Total
A1, A2, A3	200		200
BI, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, C3, C7, C8, F1	230	250	480
C6	150	210	360
D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9	180	240	420
E1, E2	190	290	480
G1, G2	150	370	520

13. ANEXOS

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi Goltapeh, E., Zare, R., & Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*, 25, 1-10.
- Adamowicz, S. J. (2015). Scientific abstracts from the 6th International Barcode of Life Conference / Résumés scientifiques du 6^e congrès international « Barcode of Life ». *Genome*, 58(5), iii-iii.
- Adams, J. (2008). DNA sequencing technologies. *Nature Education*, 1(1), 193.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5^o Edición. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Agut, M., & Calvo, M. A. (2004). In vitro conidial germination in *Arthrinium aureum* and *Arthrinium phaeospermum*. *Mycopathologia*, 157(4), 363-367.
- Ainsworth, G. C., Bisby, G. R., & Kirk, P. M. (2008). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 10^o Edición. Wallingford, Oxon, UK: CABI.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M.M. (1996). *Introductory Mycology*. New York, U.S.A.: Wiley and Sons.
- Alfaro E., Morales L., Pedraza M., Chávez T. & Morales K. (2015). Identification of fungi associated to scab symptoms in avocado crops from Michoacán, México. *Revista mexicana de Fitopatología*, 33, 77-241.
- Alvarez, E., Sutton, D. A., Cano, J., Fothergill, A. W., Stchigel, A., Rinaldi, M. G., & Guarro, J. (2009). Spectrum of Zygomycete Species Identified in Clinically Significant Specimens in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1650-1656.
- Ashworth, V. E., Chen, H., & Clegg, M. T. (2011). Persea. En C. Kole (Ed.) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 173-189) Berlin: Springer-Verlag.
- Aveskamp, Maikel M., Verkley, G. J. M., de Gruyter, J., Murace, M. A., Perelló, A., Woudenberg, J. H. C. & Crous, P. W. (2009). DNA phylogeny reveals

polyphyly of Phoma section Peyronellaea and multiple taxonomic novelties. *Mycologia*, 101(3), 363-382.

- Aveskamp, M.M., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., & Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise Phoma and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1-60.
- Ávila-Quezada, G. D., Téliz-Ortiz, D., Mora-Aguilera, G., Vaquera-Huerta, H., & Tijerina-Chávez, L. (2003). Spatial and temporal dynamics of scab (*Sphaceloma perseae* Jenk.) on avocado (*Persea americana* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 152-160.
- Ayala, T., & Ledesma, N. (2014). Avocado history, biodiversity and production. En Nandwani, P (Ed). *Sustainable Horticultural Systems, Sustainable Development and Biodiversity*. (pp. 157-205). Nashville, USA: Springer International Publishing.
- Baldauf, S. L., & Doolittle, W. F. (1997). Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(22), 12007-12012.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4° Edición. St. Paul: APS Press.
- Ben-Ya'acob, A., Solis-Molina, A., & Bulfler, G. (2003). The mountain avocado of Costa-Rica. *Persea Americana* var. *Costericensis*, A new sub-species," En *Proceedings V World Avocado Congress*, Granada-Málaga.
- Berbee, M.L. & Taylor J.W. 2001. Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. En D. McLaughlin, E. McLaughlin, P. Lemke, (Ed) *The Mycota VII Part B: systematics and evolution*. Berlin (Germany): Springer-Verlag KG.
- Bergh, B. (1992). The Origin, Nature, and Genetic Improvement of the Avocado. *California Avocado Society 1992 Yearbook*, 76, 61-75.
- Bergh, B. & Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the Avocado. *California Avocado Society 1986 Yearbook*, 70, 135-146.
- Bitancourt, A.A. & Jenkins, A.E. (1936). *Elsinoë fawcettii* the perfect stage of the *Citrus* scab fungus. *Phytopathology*, 26, 393-395.

- Boedijn, K.B. (1961). Myriangiales from Indonesia. *Persoonia*, 2, 63-75.
- Boerema, G. H., de Gruyter, J., Noordeloos, M. E., & Hamers, M. E. C. (2004). *Phoma identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture*. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314-331.
- Boyd, L. A., Ridout, C., O'Sullivan, D. M., Leach, J. E., & Leung, H. (2013). Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, 29(4), 233-240.
- Bridge, P.D., Spooner, B.M., Roberts, P.J. (2005) The impact of molecular data in fungal systematics. *Advances in Botanical Research*. 42, 33-67.
- Bruner S.C. & Jenkins A.E. (1933). Identity and host relations of the *Elsinoë* of lima bean. *Journal of Agricultural Research*, 47, 783-789.
- Burnett H. (1974). Avocado scab. Florida Department of Agriculture and Consumer Services Plant Pathology Circular, 141.
- Calabrese, F. (1992). *El aguacate*. Madrid, España: Mundi-Prensa
- Cano, C. M. (1992). First Report of *Arthrinium arundinis* Causing Kernel Blight on Barley. *Plant Disease*, 76(10), 1077B.
- Carbone, I. & Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91, 553-556.
- Ceja Torres, L., Téliz Ortiz, D., Osada Kawasoe, S., Morales García, J. (2000). Etiología, Distribución e Incidencia del Cancro del Aguacate *Persea americana* Mill. en Cuatro Municipios del Estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2), 79- 86.
- Cepero, G. M. C., Restrepo, R. S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas, T. M. E., Vargas, E. N., & Universidad de los Andes (2012). *Biología de hongos*. Bogotá: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas.
- Chanderbali, A. S., Albert, V. A., Ashworth, V. E. T. M., Clegg, M. T., Litz, R. E., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2008). *Persea americana* (avocado): bringing

ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30(4), 386-396.

- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. USA: New York Columbia University Press.
- Crous, P.W., Denman, S., Taylor, J.E., Swart, L., Bezuidenhout, C.M (2013) *Cultivation and diseases of Proteaceae: Leucadendron, Leucospermum and Protea*. 2° Edición. Utrecht: CBS Biodiversity.
- Crous, P. W., Hawksworth, D. L., & Wingfield, M. J. (2015). Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 247-267.
- Curran, J., & Webster, J. M. (1989). Genotypic analysis of heterorhabditis isolates from North Carolina. *Journal of Nematology*, 21(1), 140-145.
- Dann, E. K., Ploetz R. C., Coates L.M, & Pegg K.G (2013). Foliar, fruit and soilborne diseases". En A. W. Whiley, B., Schaffer, and B. N.Wolstenholme (Eds.), *The Avocado: Botany, Production and Uses*, (pp. 416) U.K., London: CABI Publishing.
- Deighton, F. C. (1976). Studies on Cercospora and allied genera. VI Pseudocercospora Speg., Pantospora Cif.and Cercoseptoria Petr. *Mycological Papers*, 140, 151-168.
- Druzhinina, I., & Kubicek, C. P. (2005). Species concepts and biodiversity in Trichoderma and Hypocrea: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(2), 100-112.
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in Trichoderma and Hypocrea. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 42(10), 813-828.
- Einax, E. (2003). Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Organisms Diversity & Evolution*, 3(3), 185-194.
- Everett, K. R., Rees-George, J., Pushparajah, I. P. S., Manning, M. A., & Fullerton, R. A. (2011). Molecular Identification of Sphaceloma perseae (Avocado Scab) and its Absence in New Zealand: Avocado Scab is Absent

from New Zealand. *Journal of Phytopathology*, 159(2), 106-113.

- Fan, X. L., Barreto, R. W., Groenewald, J. Z., Bezerra, J. D. P., Pereira, O. L., Cheewangkoon, R., ... Crous, P. W. (2017). Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoë* (Myriangiales, Dothideomycetes). *Studies in Mycology*, 87, 1-41.
- Fernández-Ortuño, D., Loza-Reyes, E., Atkins, S. L., & Fraaije, B. A. (2010). The CYP51C gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 301-309.
- FHIA. (2007). *Deterioro postcosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias*, 4, 2-5.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C. & Thrane, U. 1996. Moulds in food spoilage. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 33, 85-102.
- Food Agriculture Organization of the United Nations (2016). *Datos de FAOSTAT*. Consultado el 20 de febrero del 2017.
- Galindo-Tovar, M. E., Ogata-Aguilar, N., & Arzate-Fernández, A. M. (2008). Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(3), 441-450.
- Gallegos, E.R. (1983). *Algunos Aspectos del Aguacate y su Producción en Michoacán*. Universidad autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México
- Gazis, R., Rehner, S., & Chaverri, P. (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences: SPECIES DELIMITATION IN FUNGAL ENDOPHYTES. *Molecular Ecology*, 20(14), 3001-3013.
- Geiser, D. M., del Mar Jiménez-Gasco, M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., O'donnell, K. (2004). FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA Sequence Database for Identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5/6), 473-479.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed

for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330.

- Gomes, E. A., Kasuya, M. C. M., Barros, E. G., de Borges, A. C., & Araújo, E. F. (2002). Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4), 477-483.
- Guo, L. D., Hyde, K. D., & Liew, E. C. (2001). Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20(1), 1-13.
- Gutiérrez-Díez, A., Martínez-de la Cerda, J., García-Zambrano, E. A., Iracheta-Donjuan, L., Ocampo-Morales, J. D., & Cerda-Hurtado, I.M. (2009). Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(1), 09-18.
- Guzmán, L. F., Machida-Hirano, R., Borrayo, E., Cortés-Cruz, M., Espíndola-Barquera, M. del C., & Heredia García, E. (2017). Genetic Structure and Selection of a Core Collection for Long Term Conservation of Avocado in Mexico. *Frontiers in Plant Science*, 8.
- Hennebert G.L. & Sutton B.C. (1994) Unitary Parameters in Conidiogenesis. En D.L. Hawksworth (Eds.). *Ascomycete Systematics. NATO ASI Series (Series A: Life Sciences)*, vol 269. Boston, MA: Springer.
- Hernán, L. & Martínez Hilders A. (2012). Optimización de protocolo para extracción de adn del hongo fitopatógeno *macrophomina phaseolina* (tassi) goid. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. pp. 297-309.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Campos-Martínez, A., Velázquez-del Valle, M. G., Flores-Moctezuma, H. E., Suárez-Rodríguez, R., & Ramírez-Trujillo, J. A. (2015). First Report of *Colletotrichum godetiae* Causing Anthracnose on Avocado in Mexico. *Plant Disease*, 99(4), 555.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.
- Hibbett, D. S., & Taylor, J. W. (2013). Fungal systematics: is a new age of

enlightenment at hand? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 129-133.

- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Surveswaran, S., Hyde, K.D., Corke, H. & Sun, M. (2009). Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*, 36, 69-88.
- Hyde, K. D., Abd-Elsalam, K., & Cai, L. (2011). Morphology: still essential in a molecular world. *Mycotaxon*, 114(1), 439-451.
- Hyun, J. W., Yi, S. H., MacKenzie, S. J., Timmer, L. W., Kim, K. S., Kang, S. K., & Lim, H. C. (2009). Pathotypes and Genetic Relationship of Worldwide Collections of *Elsinoë* spp. Causing Scab Diseases of Citrus. *Phytopathology*, 99(6), 721-728.
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS ONE*, 6(12), e28341.
- Instituto colombiano Agropecuario (ICA) (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill) - Medidas para la temporada invernal. Consultado el 20 de noviembre del 2016.
- Jeewon, R., Liew, E. C. Y., Simpson, J. A., John Hodgkiss, I., & Hyde, K. D. (2003). Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(3), 372-383.
- Jenkins, A.E. (1925). The *Citrus* scab fungus. *Phytopathology*. 15, 99–104.
- Jenkins, A.E. (1931). Lima bean scab caused by *Elsinoë*. *Journal of Agricultural Research*, 42, 13-23.
- Jenkins, A.E. (1934). *Sphaceloma perseae* the cause of avocado scab. *Journal of Agricultural Research*, 49, 859-869.
- Joshi, S.D., Sanjay, R. & Baby, U.I., (2009). Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. associated with tea (*Camellia sinensis*) in southern India using RAPD and ISSR markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 377–383.
- Kaplan, E., Al-Hatmi, A. M. S., Ilkit, M., Gerrits van den Ende, A. H. G., Hagen, F., Meis, J. F., & de Hoog, G. S. (2018). Molecular Diagnostics of

Arthroconidial Yeasts, Frequent Pulmonary Opportunists. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(1).

- Keith, L.M., Velasquez, M.E. & Zee, F.T. (2006). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava* in Hawaii. *Plant Disease*, 90, 16–23.
- Kinzy, T. G., Ripmaster, T. L., & Woolford, J. L. (1994). Multiple genes encode the translation elongation factor EF-1 gamma in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 22(13), 2703-2707.
- Knight R.J. Jr. (2002). History, distribution an uses. En A.W. Whiley, B. Shaffer, & B.N. Wolstenholme (Eds). *The avocado: Botany, Production and Uses*. (pp-1-14) U.K. London: Cabi Publising.
- Knight, R.J. & Campbell C. W. (1999). Ecological adaptation and the evolution of modern avocado cultivars. *Revista Chapingo Serie. Horticultura*, 5, 49-54.
- Kopp, L.E. (1966). A taxonomic revision of the genus *Persea* in the Western hemisphere (*Persea-Lauraceae*). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 14(1),1-120.
- Lacap, D.C., Hyde, K.D. & Liew, E.C.Y. (2003). An evaluation of the fungal ‘morphotype’ concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 12, 53-66.
- Li, Y., Wu, H., Chen, H., & Hyde, K. D. (2011). Morphological studies in Dothideomycetes: *Elsinoe* *Elsinoaceae*, *Butleria*, and three excluded genera. *Mycotaxon*, 115(1), 507-520.
- Liu, A.-R., Chen, S.-C., Wu, S.-Y., Xu, T., Guo, L.-D., Jeewon, R., & Wei, J.-G. (2010). Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 528-535.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C. J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., & Vilgalys, R. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*, 91(10), 1446-1480.
- Maharachchikumbura, Sajeewa S. N., Zhang, Y., Wang, Y., & Hyde, K. D.

- (2013). *Pestalotiopsis anacardiacearum* sp. nov. (*Amphisphaeriaceae*) has an intricate relationship with *Penicillaria jocosatrix* the mango tip borer. *Phytotaxa*, 99(2), 49.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J., & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121-186.
 - Matheny, P. B., Liu, Y. J., Ammirati, J. F., & Hall, B. D. (2002). Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales). *American Journal of Botany*, 89(4), 688-698.
 - Mavragani, D. C., Abdellatif, L., McConkey, B., Hamel, C., & Vujanovic, V. (2007). First Report of Damping-Off of Durum Wheat Caused by *Arthrinium sacchari* in the Semi-Arid Saskatchewan Fields. *Plant Disease*, 91(4), 469-469.
 - McNeill, J., Barrie, F.F., Buck, W.R., Demoulin, V. & Greuter, W., (2012) International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Königstein: Koeltz Scientific Books.
 - Metzker, M. L. (2005). Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Research*, 15(12), 1767-1776.
 - Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews. Genetics*, 11(1), 31-46.
 - Mitchell, A., Cho, S., Regier, J. C., Mitter, C., Poole, R. W., & Matthews, M. (1997). Phylogenetic utility of elongation factor-1 alpha in noctuoidea (Insecta: Lepidoptera): the limits of synonymous substitution. *Molecular Biology and Evolution*, 14(4), 381-390.
 - Moldave, K. (1985). Eukaryotic Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 1109-1149.
 - Moore, D., Robson, G., & Trinci, T. (2011). *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge: Cambridge University Press.
 - Morales, G., J. L. & Vidales A. F. J. (1994). Enfermedades del aguacate en Michoacán. Folleto para productores Núm. 24. SARH-INIFAPCIPAC-Uruapan, Michoacán, México.
 - Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986).

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 263-273.

- Nozawa, S., Fujita, N. & Watanabe, K. (2016). First Report of Pestalotiopsis sp. Causing Brown Leaf Spot Disease in the Lily. *Tamagawa University Research Review*, 22, 29-35.
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103-116.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Casper, H. H. (1998). Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 23(1), 57-67.
- O'Donnell, K., Gueidan, C., Sink, S., Johnston, P. R., Crous, P. W., Glenn, A., & Sarver, B. A. J. (2009). A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 46(12), 936-948.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2044-2049.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Geiser, D. M., & Kang, S. (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. *Phytoparasitica*, 43(5), 583-595.
- Palmateer, A. (2006). Description of disease: Avocado scab. En Evans EA. (Ed.) *Avocado Technical Assistance Curriculum*. FL, USA: Institute of Food and Agricultural Sciences.
- Pereira, F., Carneiro, J., & Amorim, A. (2008). Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2(3), 187-199.

- Pérez-Jiménez R.M. (2008). Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2(1), 1-24.
- Pernezny, K. & Marlatt, R. (2007). *Diseases of avocado in Florida*. Bulletin Florida Cooperative Extension Service.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51-167.
- Piercey-Normore, M. D. & Egger, K. N. (2001) *Identification and genotypic characterization of filamentous fungi in Molecular and Cellular Biology of Filamentous Fungi*. U.K.: Oxford University Press
- Pittman, Y. R., Kandl, K., Lewis, M., Valente, L., & Kinzy, T. G. (2009). Coordination of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) function in actin organization and translation elongation by the guanine nucleotide exchange factor eEF1B α . *The Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4739-4747.
- Pittman, Y. R., Valente, L., Jeppesen, M. G., Andersen, G. R., Patel, S., & Kinzy, T. G. (2006). Mg²⁺ and a Key Lysine Modulate Exchange Activity of Eukaryotic Translation Elongation Factor 1B α . *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19457-19468.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756-770.
- Reeb, V., Lutzoni, F., & Roux, C. (2004). Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(3), 1036-1060.
- Rehner, S. A., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1), 84-98.
- Ren, H.Y., Li, G. & Qi, X.J. (2013). Identification and characterization of

- Pestalotiopsis spp. causing twig blight disease of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. & Zucc) in China. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 451-461.
- Renner, S. (2004). Variation in diversity among Laurales, Early Cretaceous to present. *Biologiske Skrifter*, 55, 441-458.
 - Robelo, C. A. (1904) *Diccionario de aztequismo o sea Jardín de las raíces aztecas* (3ª ed.) México: Ediciones Fuente Cultural.
 - Rodríguez, S. F. (1982). *El aguacate*. México: A. G. F. Editores
 - Roger, A. J., Sandblom, O., Doolittle, W. F., & Philippe, H. (1999). An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 16(2), 218-233.
 - Rohwer, J. G. (1993). *Flora neotropica. Monograph 58 - 61: 58. Calymperaceae*. (W. D. Reese, N. Salazar Allen, P. J. M. Maas, H. Maas-van de Kamer, & Organization for Flora Neotropica, Eds.). New York: New York Botanical Garden.
 - Rossman, A. Y., Allen, W. C., & Castlebury, L. A. (2016). New combinations of plant-associated fungi resulting from the change to one name for fungi. *IMA Fungus*, 7(1), 1-7.
 - Rossman, A. Y., Crous, P. W., Hyde, K. D., Hawksworth, D. L., Aptroot, A., Bezerra, J. L., & Zhang, Y. (2015). Recommended names for pleomorphic genera in Dothideomycetes. *IMA Fungus*, 6(2), 507-523.
 - Salazar C., Serna L., & Gómez E. (2016). Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en Pitahaya (*Selenicereus megalanthus*) *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 277-285.
 - Sangchote, S., Farungsang, U. & Farungsang, N. (1998). Pre and postharvest infection of rambutan by pathogens and effect on postharvest treatments. In: Disease control and storage life extension in fruits. *ACIAR Proceedings*, 81, 87-91.
 - Santos, J.M., Correia, V.G. & Phillips, A.J.L. (2010) Primers for mating-type diagnosis in Diaporthe and Phomopsis, their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114, 255–270.
 - Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque,

- C. A., & Schindel, D. (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), 6241-6246.
- Schoch, Conrad L., Sung, G.-H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., & Spatafora, J. W. (2009). The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Systematic Biology*, 58(2), 224-239.
 - Scora, R. W., Wolstenholme, B. N., & Lavi, U. (2002). Taxonomy and botany. En A. W. Whaley, B., Schaffer, & B. N. Wolstenholme (Eds.) *The Avocado: Botany, Production and Uses*, (pp. 15–37). U.K. London: CABI Publishing.
 - Sexton, A. C., & Howlett, B. J. (2006). Parallels in Fungal Pathogenesis on Plant and Animal Hosts: FIG. 1. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 1941-1949.
 - Shear, C.L. (1929). The life-history of *Sphaceloma ampelinum* de Bary. *Phytopathology*, 19, 673-679.
 - Singara, M.A., (2015). Fungi: An overview. En B., Bahadur, V., Rajam, L., Sahijram, K.V. Krishnamurthy (Eds.). *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*. India:Springer.
 - Silva-Rojas, H. V., & Ávila-Quezada, G. D. (2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado: Anthracnose caused by *C. boninense*. *Plant Pathology*, 60(5), 899-908.
 - Smilanick, J. L. (2002). Management of Postharvest Decay of Avocado Fruit. *Avocado Source*. Symposium, 105-112.
 - Stevens, H. (1918). Avocado scab. *Florida Agricultural Experiment Station Bulletin*, 289, 2.
 - Stiller, J. W., & Hall, B. D. (1997). The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4520-4525.
 - Storey, W.B., Berg, B. & Zentmyer, G.A. (1986). The origin, Indigenous range,

and dissemination of the avocado. *California Avocado Society Yearbook*, 70, 127-133.

- Sun, H.T. & Cao, R.B. (1990). Identification of *Pestalotiopsis* parasitized on fruit crops (in Chinese). *Acta Agriculturae University Zhejiangensis* 16, 179-185.
- Swart L., Crous P.W. & Kang J.C. (2001). Differentiation of species of *Elsinoë* associated with scab disease of *Proteaceae* based on morphology symptomatology and ITS sequence phylogeny. *Mycologia*, 93, 366-379.
- Tamayo, P. J. (2007). Enfermedades del aguacate. *Politécnica*, 4, 51-70.
- Tan, M.K., Timmer, L.W. & Broadbent, P. (1996). Differentiation by molecular analysis of *Elsinoë* sp. causing scab disease of *Citrus* and its epidemiological implications. *Phytopathology*, 86, 1039-1044.
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90(1), 135-159.
- Téliz D. & Mora A. (2013). *El aguacate y su manejo integrado*. (2a ed.) México, D. F.: Mundi-Prensa.
- Thomas, T.V., Eicker, A. & Robbertse, P.J. 1994. Possible role of fungi in negatively affecting fruit-set in avocados. *South African Journal of Botany*, 60, 251-256.
- Trigos, Á., Ramírez, K., & Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista mexicana de micología*, 28(spe), 125-129.
- Udayanga, D., Liu, X., Crous, P.W., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. (2012) A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity*, 56, 157–171.
- Valadez E. & Kahl G. (2000). *Huellas de ADN en genomas de plantas*. México: Mundi Prensa Universidad Autónoma Chapingo.
- Valencia, A. L., Torres, R., & Latorre, B. A. (2011). First Report of *Pestalotiopsis clavispora* and *Pestalotiopsis* spp. Causing Postharvest Stem End Rot of Avocado in Chile. *Plant Disease*, 95(4), 492-492.

- Valle-Aguirre, G., Velázquez-del Valle, M. G., Corona-Rangel, M. L., Amora-Lazcano, E., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2016). First aeromycological study in an avocado agroecosystem in Mexico. *Aerobiologia*, 32(4), 657-667.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. & Kahl G. (2005). DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications. 2° ed. USA: CRC Press.
- White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafaro, M. J., Tanabe, Y., & Sugiyama, J. (2006). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98(6), 872-884.
- Wijayawardene, N. N., Crous, P. W., Kirk, P. M., Hawksworth, D. L., Boonmee, S., Braun, U., & Hyde, K. D. (2014). Naming and outline of Dothideomycetes–2014 including proposals for the protection or suppression of generic names. *Fungal Diversity*, 69(1), 1-55.
- Wiwik S., Dewa N., Made S., & Made I. (2013). First report on *Fusarium solani*, a pathogenic fungus causing stem rot disease on dragon fruits (*Hylocereus* sp.) in Bali. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 3(17):93-99.
- Williams, L. O. (1977). The avocados, a Synopsis of the genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany*, 31(3), 315-320.
- Wogu, M. (2014). Microorganisms associated with the spoilage of avocado pear, *Persea Americana* fruits. *AFRREV STECH: An International Journal of Science and Technology*, 3(2), 244.
- Wolf, C., Rentsch, J., & Hübner, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1350-1355.
- Xu, L., Kusakari, S. & Hosomi, A. (1999). Postharvest disease of grape caused by *Pestalotiopsis* species. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 65, 305-311.
- Xu, X.-M., Parry, D. W., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Edwards, S. G., & Tatnell, J. (2005). Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology*, 112(2), 143-154.
- Zehner, R., Zimmermann, S., & Mebs, D. (1998). RFLP and sequence analysis

of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International Journal of Legal Medicine*, 111(6), 323-327.

- Zentmyer, G.A. (1959). Avocado diseases in Latinamerica. *Plant Disease Reporter*, 43, 1229.