



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y

RECURSOS NATURALES

**Etiología del anillamiento de pedúnculo de frutos de
aguacate variedad 'Hass' en la zona productora del
Estado de México.**

TESIS

QUÉ PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN

CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS

NATURALES

PRESENTA

RAMÍREZ MENDOZA MARÍA DEL CARMEN

Tenancingo, Estado de México, Enero, 2024





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**Etiología del anillamiento de pedúnculo de frutos de
aguacate variedad 'Hass' en la zona productora del
Estado de México.**

TESIS

**QUÉ PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

PRESENTA

RAMÍREZ MENDOZA MARÍA DEL CARMEN

COMITÉ DE TUTORES

Dr. en C. JUAN CARLOS REYES ALEMÁN

Dr. en C. ROMÚLO GARCÍA VELASCO

Dr. en C. GERARDO JUSTINO GONZÁLEZ DÍAZ



Tenancingo, Estado de México, Enero, 2024

RESUMEN

El anillamiento de pedúnculo en frutos de aguacate se considera como una de las cinco principales enfermedades que atacan al cultivo principalmente en la variedad 'Hass', se sabe que esta enfermedad ocasiona la caída de frutos desde tamaño canica hasta fruto mediano, ocurriendo principalmente en la época de mayo y junio la cual coincide con el inicio de las lluvias, la enfermedad se manifiesta con anillamiento en el pedúnculo a 1 cm de la base del fruto poniendo de color púrpura al fruto y en algunos casos la momificación de éste.

Sin embargo, esta enfermedad continúa con etiología desconocida ya que ha sido asociada a diferentes factores tales como estrés hídrico, deficiencia nutrimental de Zn, bacterias así como hongos fitopatógenos. México ocupa el primer lugar a nivel mundial en la producción de aguacate, siendo los principales estados productores Michoacán, Jalisco y el Estado de México. Por lo que hasta el momento el Estado de México es considerado como el tercer productor a nivel nacional en la producción de aguacate.

Debido al desconocimiento del agente que causa el anillamiento en pedúnculo se colectaron 90 frutos de aguacate variedad 'Hass' que presentaban los signos característicos de daño por anillamiento, las colectas se realizaron en tres municipios productores del Estado de México de los cuales se obtuvieron aislamientos de hongos patógenos logrando identificar de manera morfológica a los géneros *Alternaria tenuissima*, *Epicoccum nigrum* y *Cladosporium cladosporioides*.

Así mismo se realizó la identificación molecular de los patógenos mencionados mediante la amplificación de las regiones internas de los genes ribosomales 18S-5.8 S y 5.8S-28S con los cebadores universales ITS4 e ITS5 y de gen B-tubulina (Bt2a y Bt2b) específicamente para el género *Alternaria tenuissima* confirmando mediante esta técnica lo encontrado mediante identificación morfológica.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron *in vitro* y *ex vitro* con frutos sanos de aguacate 'Hass' en tamaño huevo de paloma (3 a 4 cm) en donde se inocularon siete

tratamientos más un testigo, dichos tratamientos fueron la combinación de los hongos identificados, la concentración de inóculo utilizada fue 1×10^5 .

En las pruebas de patogenicidad realizadas en laboratorio se logró la replicación de los síntomas de manera general en todos los tratamientos, excepto el testigo en donde no se observó daño en el pedúnculo ni en el pericarpio del fruto, la variable de incidencia dio como resultado que el mayor porcentaje de incidencia fue dado por la interacción de *A. tenuissima* y *C. cladosporioides*, sin embargo es aún más alta cuando *C. cladosporioides* actúa de manera independiente, de manera general se lograron observar los síntomas característicos de la enfermedad como fue daño en el pedúnculo, pudrición de pulpa y manchas de coloración roja a purpura.

A diferencia de la replicación de síntomas en las pruebas de patogenicidad establecidas en laboratorio, las pruebas realizadas para cumplir con los postulados de Koch en campo no permitieron la replicación de los síntomas, esto pudiera deberse a que en campo no es posible brindar las condiciones necesarias como temperatura, luz, humedad entre otros factores.

ABSTRACT

Peduncle ringing in avocado fruits is considered one of the five main diseases that attack the crop mainly in the 'Hass' variety, it is known that this disease causes the fall of fruits from marble size to medium fruit (1 a 7 cm), occurring mainly in the time of May and June, which coincides with the beginning of the rains, the disease manifests itself with ringing on the peduncle 1 cm from the base of the fruit, turning the fruit purple and in some cases the mummification of the fruit.

However, this disease continues with unknown etiology as it has been associated with different factors such as water stress, nutrient deficiency of Zn, bacteria as well as phytopathogenic fungi. Mexico ranks first in the world in avocado production, with the main producing states being Michoacán, Jalisco, and the State of Mexico. So far, the State of Mexico is considered the third largest producer in the country in avocado production.

Due to the lack of knowledge of the agent that causes peduncle ringing, 90 avocado fruits of the 'Hass' variety that presented the characteristic signs of ringing damage were isolated, the collections were carried out in three producing municipalities of the State of Mexico, from which isolates of pathogenic fungi were obtained, managing to morphologically identify the genera *Alternaria tenuissima*, *Epicoccum nigrum* and *Cladosporium cladosporioides*.

It is also, the molecular identification of the pathogens was carried out by amplifying the internal regions of the ribosomal genes 18S-5.8 S and 5.8S-28S with the universal primers ITS4 and ITS5 and the B-tubulin gene (Bt2a and Bt2b) specifically for the genus *Alternaria tenuissima*, confirming by this technique what has already been found through morphological identification.

Pathogenicity tests were performed *in vitro* and *ex vitro* with healthy 'Hass' avocado fruits in pigeon egg size where seven treatments plus a control were inoculated, these treatments were the combination of the identified fungi, the inoculum concentration used was 1×10^5 .

In the pathogenicity tests carried out in the laboratory, the replication of the symptoms was achieved in a general way in all treatments, except for the control where no damage

was observed in the peduncle or pericarp of the fruit, the incidence variable resulted in the highest percentage of incidence being due to the interaction of *A. tenuissima* and *C. cladosporioides*, however it is even higher when *C. cladosporioides* acts independently, in general, it was possible to observe the *characteristic* symptoms of the disease such as damage to the peduncle, pulp rot and red to purple spots.

Unlike symptom replication in established pathogenicity tests in the laboratory, tests performed to comply with Koch's postulates, In the field they did not allow the replication of the symptoms, this could be since in the field it is not possible to provide the necessary conditions such as temperature, light, humidity among other factors.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCION	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Importancia del cultivo de aguacate	3
2.1.1. Fenología del aguacate var. 'Hass'	4
2.2. Pérdidas de producción por enfermedades	5
2.3. Anillamiento de pedúnculo.....	6
2.3.1. Condiciones climáticas que intervienen en el anillamiento del pedúnculo (AP)	7
2.3.2. Trabajos relacionados al anillamiento de pedúnculo	7
2.4. Pasos requeridos para la identificación de hongos	10
2.5. Características generales de los hongos asociados a la pudrición del pedúnculo de fruto del aguacate	10
2.5.1. <i>Alternaria</i> sp	10
2.5.2. <i>Alternaria tenuissima</i>	12
2.5.3. Identificación molecular de <i>Alternaria</i>	14
2.6. <i>Epicoccum</i> sp	14
2.6.1. Descripción morfológica de <i>Epicoccum nigrum</i>	15
2.6.2. Daños reportados en cultivos por <i>E. nigrum</i>	16
2.6.3. Identificación molecular de <i>Epicoccum</i>	17
2.7. Identificación morfológica del género <i>Cladosporium</i> sp	18
2.7.1. Descripción morfológica de <i>Cladosporium</i> sp.....	18
2.7.2. Características morfológicas de <i>Cladosporium cladosporioides in vivo</i> ...	19
2.7.3. Características morfológicas de <i>Cladosporium cladosporioides in vitro</i> ..	20
2.7.4. Características del medio de cultivo	21
2.7.5. Identificación molecular del género <i>Cladosporium</i>	22
2.8. Importancia de la identificación molecular en hongos	22
2.9. ITS (Espaciador transcrito interno)	22

2.10. Postulados de Koch.....	23
2.10.1. Importancia de los postulados de Koch	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4. JUSTIFICACIÓN.....	25
5. HIPÓTESIS.....	25
6. OBJETIVO GENERAL	25
6.1. Objetivos específicos.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Colecta del material sintomatológico	27
7.2. Procesamiento de las muestras	28
7.2.1. Aislamiento	28
7.2.2. Cultivos monospóricos.....	29
7.3. Identificación morfológica de los hongos.....	30
7.3.1. Identificación mediante análisis molecular (PCR).....	31
7.4. Preparación de material vegetal e inóculo para las pruebas de patogenicidad .	33
7.4.1. Preparación del inóculo	33
7.4.2. Preparación del material vegetal (frutos) para la inoculación	34
7.5. Diseño experimental.....	34
7.5.1. Variables evaluadas	36
7.6. Re-aislamiento de los hongos inoculados	37
7.7. Prueba de patogenicidad <i>ex vitro</i>	38
7.8. Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS.....	41
7.1. Aislamientos	41
7.2. Identificación morfométrica de las especies evaluadas.....	43
7.2.1. <i>Alternaria tenuissima</i> (Nees & T. Nees: Fr.)	43
7.2.2. <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen)	46
7.2.3. <i>Epicoccum nigrum</i> Link.....	48
7.3. Análisis molecular.....	50
7.4. Pruebas de patogenicidad en laboratorio	52
7.4.1. Variables evaluadas <i>in vitro</i>.....	52

7.4.2.	Pruebas de patogenicidad <i>ex vitro</i>	57
7.4.3.	Manifestación de síntomas observados en campo	59
7.5.	Re-aislamiento de hongos de los frutos inoculados <i>in vitro</i>	62
7.6.	Re-aislamiento de hongos inoculados <i>ex vitro</i>	63
8.	DISCUSIÓN	65
9.	CONCLUSIONES	69
10.	LISTA DE REFERENCIAS	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Trabajos asociados al anillamiento de pedúnculo	8
Cuadro 2.	Municipios del Estado de México en donde se realizó la colecta del material vegetal.....	27
Cuadro 3.	Mezcla de reacción para la amplificación por PCR.	32
Cuadro 4.	Secuencia de los primers utilizados para la amplificación del DNA de los patógenos estudiados.....	32
Cuadro 5.	Condiciones de los ciclos de amplificación mediante PCR.	33
Cuadro 6.	Patógenos involucrados en los diferentes tratamientos utilizados en el proceso de inoculación	39
Cuadro 7.	Porcentaje de frecuencia obtenida de hongos aislados a partir de las colectas de frutos realizadas en los municipios de Coatepec Harinas, Donato Guerra y Malinalco, Estado de México.	41
Cuadro 8.	Porcentaje de aparición de patógenos encontrados en el proceso de aislamiento de las colectas realizadas por municipio colectado	43
Cuadro 9.	Resultados de la identificación molecular a nivel de especie de los géneros <i>Alternaria</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp., y <i>Cladosporium</i> sp., mediante la amplificación con ITS's y del gen β - tubulina comparados con accesiones del GenBank.....	51
Cuadro 10.	Variables evaluadas en laboratorio que mostraron diferencia mínima significativa.....	53
Cuadro 11.	Variables de daño en pulpa y días a aparición de micelio evaluadas en laboratorio.....	54

Cuadro 12. Severidad en frutos de aguacate inoculados con <i>A. tenuissima</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>E. nigrum</i> y sus combinaciones.	55
Cuadro 13. Variables que presentaron diferencia significativa únicamente con <i>Alternaria tenuissima</i> en las pruebas de patogenicidad establecidas en campo	58
Cuadro 14. Porcentaje de severidad de los diferentes tratamientos evaluados en campo.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patrón de esporulación de <i>A. tenuissima</i> , de Simmons (2007).....	13
Figura 2. Estructuras morfológicas de especies del género <i>Epicoccum</i> sp., de (Aveskamp et al., 2010).....	16
Figura 3. Estructuras morfológicas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> , de Bensch et al, (2012).	21
Figura 4. Proceso de desinfección y siembra de tejido vegetal enfermo; A) Desinfección y enjuague de pedúnculos para el aislamiento de patógenos. B) Siembra de cortes de pedúnculo en cajas de Petri con medio de cultivo PDA y C) aparición de hongos a partir de tejido vegetal sembrado	28
Figura 5. Proceso de obtención de colonias monosporicas. A) Recolección de esporas mediante micropipeta, B) Crecimiento de colonias monosporicas, C) Medición de crecimiento de las colonias y D) Conteo de conidios en cámara Neubauer bajo microscopio	30
Figura 6. Proceso de inoculación de patógenos en experimento <i>in vitro</i> A) Selección de frutos de apariencia sana, B) Establecimiento de las unidades experimentales, C) Provocación de heridas en el pedúnculo del fruto con ayuda de aguja estéril, D) Aspersión de conidios con micro aspersor a los frutos de aguacate, D) Sellado de los tratamientos con domo de plástico.	35
Figura 7. Escala de daño en frutos de aguacate var. 'Hass' propuesta para medir la severidad de la lesión en los frutos inoculados.....	37

Figura 8. Inoculación de frutos ex vitro. A) Selección de frutos sanos y medición con vernier: B) Aspersión de conidios para la inoculación de frutos con los diferentes tratamientos: C) Protección de frutos inoculados cubiertos con bolsas de celofán para evitar contaminación..... 39

Figura 9. Frecuencia de aparición de los hongos encontrados en los aislamientos de los pedúnculos que presentaron lesiones de anillamiento de pedúnculo en los diferentes municipios del Estado de México..... 42

Figura 10. Características culturales y morfométricas de *Alternaria tenuissima*. A) Colonia de *A. tenuissima* de crecimiento plano cultivada en medio PCA; B) Crecimiento de la colonia de *A. tenuissima* observada por la parte inferior. C) Conidios en cadena de 4-13 originados de conidióforos primarios de crecimiento erecto; D) Medición de conidios muriformes con reglilla micrométrica 45

Figura 11. Características culturales y morfométricas de *Cladosporium cladosporioides*. A) Colonia de *C. cladosporioides* con micelio flocoso cultivada en medio PDA de la parte frontal: B) Crecimiento de la colonia de *C. cladosporioides* observada por la parte del reverso: C) Conidios solitarios desprendidos del conidióforo: D) medición de conidios unicelulares con reglilla micrométrica 47

Figura 12. Características culturales y morfométricas de *Epicoccum nigrum*. A) Colonia de *Epicoccum nigrum* de crecimiento plano y desarrollo de micelio algodonoso crecida en medio PDA: B) Crecimiento de la colonia observada por la parte inferior presentando coloración rojiza; C) Formación de clamidosporas multicelulares: D) Micelio cenocítico y clamidosporas globosas de *E. nigrum*..... 49

Figura 13. Sintomatología desarrollada en frutos inoculados con *Epicoccum nigrum*. A) Fruto con daño en pedúnculo y coloración purpura en epicarpio, B) Corte longitudinal en fruto mostrando lesiones de color café a oscuras en la pulpa, C) Crecimiento de micelio en la pulpa del fruto observado bajo microscopio estereoscópico..... 52

Figura 14. Síntomas observados en frutos inoculados con los diferentes hongos actuando en conjunto y de manera independiente. T1) *Alternaria* + *Epicoccum* + *Cladosporium*; T2) *Alternaria* + *Epicoccum*; T3) *Alternaria* + *Cladosporium*; T4) *Epicoccum* + *Cladosporium*; T5) *Epicoccum*; T6) *Alternaria*; T7) *Cladosporium*; T8) Testigo..... 57

Figura 15. Sintomatología del anillamiento de pedúnculo del aguacate *ex vitro* por efecto de los tratamientos: T1) *Alternaria*, *Epicoccum* y *Cladosporium*: T2) *Alternaria* y *Epicoccum*: T3) *Alternaria* y *Cladosporium*: T4) *Epicoccum* y *Cladosporium*: T5) *Epicoccum*: T6) *Alternaria*: T7) *Cladosporium*: T8) Testigo 61

Figura 16. Desarrollo de síntomas observados en los frutos inoculados *ex vitro*: A) mancha café en el pedúnculo del fruto; B) aparición de manchas cafés y deshidratación de pedúnculos en los frutos inoculados; C) pérdida de turgencia y deshidratación de los frutos..... 62

Figura 17. Recuperación de patógenos inoculados en laboratorio, se observan los ocho tratamientos, 1 (*A. tenuissima*, + *E. nigrum* + *C. cladosporioides*); 2(*A. tenuissima* + *E. nigrum*); 3 (*A. tenuissima* + *C. cladosporioides*); 4 (*E. nigrum* + *C. cladosporioides*); 5 (*E. nigrum*); 6 (*A. tenuissima*); 7 (*C. cladosporioides*); y 8 (testigo)..... 63

Figura 18. Recuperación de patógenos inoculados en campo se observan los ocho tratamientos, 1 (*A. tenuissima*, + *E. nigrum* + *C. cladosporioides*), 2 (*A. tenuissima* + *E. nigrum*), 3 (*A. tenuissima* + *C. cladosporioides*), 4 (*E. nigrum* + *C. cladosporioides*), 5 (*E. nigrum*), 6 (*A. tenuissima*), 7(*C. cladosporioides*) y 8 (testigo)..... 64

1. INTRODUCCION

Datos de la FAO, indican que México es considerado como el principal productor de aguacate a nivel mundial, tan sólo para el 2020 se reportaron 2,393, 849 toneladas de producción mientras que para 2021 la producción incremento a 2,448,279.15 t, seguido de la Republica Dominicana y Perú (FAOSTAT, 2022). A nivel nacional la producción de aguacate está concentrada en el Estado de Michoacán en primer lugar de acuerdo con datos del SIAP hasta diciembre de 2021 obtuvo una producción de 1, 831,622.33 toneladas, lo que hace que este estado sea el principal productor a nivel nacional, los estados que le siguen son Jalisco con 256, 002.36 t y el Estado de México con 123,446.04 t (SIAP, 2022).

En el Estado de México la producción de aguacate se centra en los municipios de Coatepec Harinas con 2177 ha, Temascaltepec con 1538 ha, Donato Guerra 1531 ha, Valle de Bravo 982 ha, Tenancingo 884 ha, Almoloya de Alquisiras 575 ha, Villa de Allende 502 ha y Malinalco 430 ha sembradas participando otros municipios en menor proporción generando un total de producción para el año 2021 de 123, 446.04 t (SIAP, 2022).

Dada la importancia económica que tiene el cultivo de aguacate a nivel mundial cada vez son más los productores que se suman a establecer huertas de este cultivo; sin embargo, así como la superficie sembrada aumenta las plagas y enfermedades se encuentran con mayor frecuencia en este frutal, se dice que el cultivo de aguacate es atacado por al menos 19 enfermedades de origen fungoso, dos de tipo bacteriano y una causada por algas, mencionando que sólo cinco han sido consideradas de importancia económica por afectar la calidad y cantidad de la cosecha (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaría [CEDERSSA] , 2017).

Dentro de las cinco enfermedades que se consideran de impacto económico se encuentran la antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporoides*, la roña causada por *Sphaceloma perseae*, la tristeza del aguacatero generada por el

oomicete *Phytophthora cinnamomi*, enfermedades poscosecha y el anillamiento de pedúnculo (Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria [CEDERSSA] , 2017).

Al ser las enfermedades los factores principales que limitan la producción del aguacate, es necesario llevar un manejo adecuado de estas, sin embargo, no siempre es posible un adecuado control, pues su manejo se dificulta cuando nos encontramos con enfermedades de etiología desconocida, tal es el caso del anillamiento de pedúnculo ya que es considerada como la causante de la caída de frutos de tamaño canica hasta frutos medianos en la variedad 'Hass' reduciendo así la producción de manera significativa. "El daño se manifiesta en el pedúnculo aproximadamente a 1 cm del fruto, haciendo un ahorcamiento que provoca la necrosis del pedúnculo o un aspecto corchoso. Sin embargo, aún se desconoce el agente causal, pero ha sido asociado con deficiencias nutrimentales como lo refiere Finazzo *et al.* (1994), o bien a un problema sanitario provocado por bacterias u hongos (Teliz, 2000).

Debido a que la etiología del anillamiento del pedúnculo en frutos de aguacate continúa siendo desconocida, la presente investigación tuvo como objetivos aislar e identificar morfológicamente los agentes fitopatógenos a partir de pedúnculos con lesiones de anillamiento colectados en municipios del Estado de México, así como su análisis molecular y cumplir con las pruebas de patogenicidad mediante los postulados de Koch en frutos de aguacate var. 'Hass' en campo y en laboratorio.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del cultivo de aguacate

El origen del aguacate de acuerdo a la historia se dice que surge en la parte central de México así como el este y en las partes altas de Guatemala, siendo México uno de los países con mayor diversidad de aguacates teniendo al menos 20 especies relacionadas a este frutal, pertenece a la familia Lauraceae y al género *Persea* subgénero *Persea americana* Mill, comprendiendo alrededor de 85 especies y cultivándose actualmente desde el sur de los Estados Unidos hasta Chile, para la identificación del subgénero *Persea* existen dos claves que fueron propuestas por Lucille E. Kopp (1966) y Louis O. Williams (1977) las cuales siguen vigentes (Barrientos - Priego y López - López, 2014).

Se considera a México como el principal productor de aguacate a nivel mundial, tan sólo para el 2020 se reportaron 2,393, 849 toneladas de producción mientras que para 2021 la producción incremento un 2.27%, seguido de la Republica Dominicana con 676,337 t y Perú con 660,003 t (FAOSTAT, 2022), respecto a la producción nacional se considera a Michoacán como el principal productor según datos del SIAP hasta diciembre de 2021 obtuvo una producción de 1, 831,622.33 t seguido de Jalisco con 256, 002.36 t y el Estado de México con 123,446.04 t (SIAP, 2022).

Al realizar un comparativo a nivel nacional de la superficie de aguacate sembrada en el año 2010 fue de 134,322.12 ha, mientras que la superficie cosechada disminuyó a 123, 403.69 ha, lo que indica que se perdió el 8.1 % del total y para 2018 se reportó una superficie sembrada de 231,028.04 ha, y una superficie cosechada de 206, 077.93 ha, lo que representa una pérdida de 10.8 % del total de hectáreas sembradas (SIAP, 2022). Por lo que se puede inducir que las pérdidas, fueron menores que en los últimos años, lo cual se debe principalmente a la pérdida total de plantas, por efectos climáticos, a plagas o enfermedades (CEDERSSA 2017).

El Estado de México cuenta con una superficie sembrada de 12,355.94 ha y su superficie cosechada de 10,269.66 ha, con una producción anual de 123,464.32 t, y un rendimiento

promedio de 12.02 t ha⁻¹ de acuerdo con reportes del SIAP (2022). Estos datos nos indican que a pesar de la cantidad de áreas sembradas no todas llegan a ser cultivadas.

Para el año 2021 Coatepec Harinas reportó una producción de 32,328.42 t con una superficie sembrada de 2,177 ha mientras que de superficie cosechada fue de 2,055 ha, por su parte Donato Guerra su producción fue de 15,548 t en una superficie sembrada de 1,531 ha y superficie cosechada de 1,327 ha, Malinalco obtuvo una producción de 4,255.80 t con una superficie sembrada de 430 ha y su superficie cosechada fue de 330 ha (SIAP, 2022), estos datos denotan la importancia económica del cultivo del aguacate tanto a nivel nacional como a nivel estado.

2.1.1. Fenología del aguacate var. 'Hass'

La importancia de conocer el comportamiento del cultivo de aguacate permite tener un adecuado control en cuanto a manejo de los huertos como es el caso de riegos, podas y fertilizaciones pues el conocer con precisión la duración de las etapas fenológicas del cultivo se obtiene un control adecuado además de que se sabe con exactitud las diferentes fechas de los flujos vegetativos y reproductivos de los árboles (Rocha-Arroyo *et al.*, 2010).

Así mismo, Rocha-Arroyo *et al* (2010), mencionan que, para la transformación de la yema vegetativa a reproductiva los estímulos son provocados por el ambiente, una vez iniciados los cambios, el meristemo apical del aguacate cambia de forma cónica a aplanada, señalando que al inicio de la transformación algunas condiciones como la lluvia, riego abundante, temperatura cálida, poda, aplicación de fertilizantes nitrogenados o reguladores de crecimiento pueden inhibir el proceso. Por su parte, Salazar – García y colaboradores (1999) ya hacían mención sobre la determinación irreversible a la floración (DIF) la cual no es otra cosa más que el cambio en la que la yema del brote vegetativo pasa ha estado reproductivo sin poder ser modificada ya sea por tratamientos o prácticas que inhiban la floración.

La fecha en la que se lleva a cabo la DIF en aguacate es dada en función del cultivar, las condiciones climáticas y la edad de los brotes.

Al trabajar con la DIF Rocha - Arroyo *et al* (2010), reportan que en los brotes de flujos vegetativos de invierno, primavera y verano en árboles de la variedad 'Hass' el proceso se lleva a cabo de manera anticipada en climas templados a diferencia de lugares con clima cálido.

Algunos estudios sobre la fenología del aguacate indican que la diversidad climática de los diferentes lugares donde se establece la variedad 'Hass' provoca en los árboles la producción de tres flujos vegetativos los cuales ocurren en invierno, primavera y el verano, mencionando que pudieran llegar a ser hasta cuatro flujos de floración identificados como (loca, aventajada, normal y marceña) a lo largo del año (Paz 1997; Salazar-García *et al.*, 2006).

De acuerdo con algunos estudios realizados reportan que en la fenología de 'Hass' el flujo vegetativo de invierno es dado a finales de noviembre hasta finales de febrero, el flujo de primavera a finales de febrero a inicio de junio, el flujo de verano se establece a comienzos de junio y principios de septiembre (Rocha - Arroyo *et al* , 2010).

Como se menciona anteriormente la fenología del aguacate 'Hass' esta determinada por el clima de cada lugar, en el Estado de México se reporta que esta variedad comprende dos periodos de floración a lo largo del año, el primero va de agosto a octubre y es conocida como la floración de verano, su período de cosecha para esta floración será en los meses de agosto a octubre, mientras que la segunda floración conocida como floración de invierno se presenta a partir de diciembre a febrero y su época de cosecha es en los meses de noviembre a febrero, según lo reportado por (Reyes-Alemán *et al.*, 2021).

2.2. Pérdidas de producción por enfermedades

Se estima que las enfermedades del aguacate reducen el rendimiento hasta en un 40 %, siendo así un factor que incrementa los costos de producción. Del total de las enfermedades que atacan al cultivo se considera que 19 de ellas son de origen fungoso, dos de tipo bacteriano y una por algas, pero sólo cinco de estas enfermedades son clasificadas de importancia económica por afectar la calidad y cantidad de la cosecha,

dichas enfermedades son: la antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides*), la roña (*Sphaceloma persea*), el anillamiento del pedúnculo, la tristeza (*Phytophthora cinnamomi*) y las enfermedades pos-cosecha (CEDERSSA 2017).

2.3. Anillamiento de pedúnculo

Valencia y Téliz (2007), han descrito al anillamiento de pedúnculo o pedicelo del fruto del aguacate como un problema que se presenta con alta incidencia y disminuye considerablemente la producción de aguacate ya que esta enfermedad promueve la caída de frutos en varios estados de desarrollo del fruto presentandose principalmente en frutos pequeños, el daño puede llegar a considerarse desde un 5 a 100 % de los frutos y se presenta principalmente en la variedad 'Hass'.

La enfermedad se caracteriza por presentar síntomas como la formación de un anillo café rojizo alrededor del pedúnculo cerca de la unión con el fruto, presentando una zona seca y descortezada, algunas de las veces el anillo sólo es de manera superficial y el fruto se logra retener hasta su madurez. En su mayoría el fruto adquiere forma redonda y coloración purpura en el pericarpio, hay caída abundante de los frutos o bien el fruto queda adherido al árbol pero con aspecto momificado, al realizar cortes longitudinales se ha observado la presencia de necrosis en la pulpa así como cavidades que contienen abundante micelio (Valencia y Téliz, 2007).

Este problema se a reportado en California, Israel, Australia, Sudáfrica, Perú, Puerto Rico, India y Argentina, en México se a registrado en los estados de Veracruz, Puebla, Morelos, Colima y San Luis Potosí mientras que en Michoacán considerán esta enfermedad como endémica de toda la zona (Valencia y Téliz, 2007).

Hasta la fecha el anillamiento de pedúnculo continua como una enfermedad poco estudiada debido a lo complejo de la patología que presenta, Ramírez y Morales (2019) mencionan que pese a que las enfermedades de este frutal se han estudiado desde tiempos remotos algunas de ellas continúan con etiologías poco conocidas siendo una de estas el anillamiento del pedúnculo ya que no se ha logrado identificar claramente.

Ramírez y Morales (2019), observaron que este desorden se presenta con frecuencia en frutos pequeños durante el llenado del fruto, mostrándose como un anillo en la parte del pedúnculo, lo que hace que el fruto adquiera una tonalidad púrpura hasta el ápice, pudiendo quedar adherido al árbol mostrando una deshidratación gradual hasta causar desprendimiento o momificación. Sin embargo, en su trabajo de aislamiento no fue posible replicar los síntomas en las pruebas de patogenicidad.

Por otra parte, Sánchez *et al.* (2001), citado por Pineda - Fonseca y colaboradores (2006) refieren que el anillamiento del pedúnculo en frutos de aguacate se ha considerado como una enfermedad causada por desórdenes fisiológicos, patológicos o por desbalance nutricional, por lo que continúa sin poderse determinar la causa exacta del problema.

2.3.1. Condiciones climáticas que intervienen en el anillamiento del pedúnculo (AP)

Los factores que favorecen la presencia de la enfermedad son; la humedad relativa en un 80 % y la temperatura de 10 a 26°C, la asociación de estos dos favorece la disminución de crecimiento de la semilla lo que ocasiona la merma en el cuajado del fruto y que exista más susceptibilidad a la entrada de patógenos (Sánchez *et al.*, 2001, citado por Pineda - Fonseca *et al.*, 2006).

2.3.2. Trabajos relacionados al anillamiento de pedúnculo

Diversos estudios han abordado el tema de los posibles agentes causales del anillamiento, atribuyéndolo tanto a factores ambientales, hongos, bacterias y deficiencias nutrimentales, en el Cuadro 1 se pueden observar algunos de los trabajos realizados respecto al anillamiento de pedúnculo.

Cuadro 1. Trabajos asociados al anillamiento de pedúnculo

Autores	Resumen
Salgado (1993)	A partir de tejido vegetal con síntomas de anillamiento de pedúnculo lograron aislar en medio PDA los patógenos, encontrando presentes a los géneros <i>Fusarium</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. y <i>Verticillium</i> sp, señalando que no se realizaron pruebas de patogenicidad.
Finazzo <i>et al</i> , (1994)	Reportan que el daño por anillamiento en pedúnculo ha sido asociado con deficiencias nutrimentales por un desbalance, afectando el estado fisiológico de la planta principalmente de microelementos tales como el Zn el cual es fundamental para la producción de auxinas.
Wolstenholme <i>et al</i> , (1998)	Mencionan que el anillamiento del pedúnculo está asociado a la degradación de la cubierta seminal del fruto, en su trabajo sobre acolchados en huertos de aguacate, observaron que con coberteras mejora la calidad de las raíces lo cual reduce la incidencia del anillamiento en pedúnculos en un 47 % y de la degradación prematura de la cubierta de la semilla en un 39 %, refiriendo que el uso de cubiertas disminuye el estrés de los árboles.
Salazar-García <i>et al</i> , (2006)	Registraron una caída significativa de frutos correspondientes a la llamada caída de junio, la cual se observó un mes después del inicio del periodo de lluvias, atribuyendo la caída a una competencia fuerte de carbohidratos, agua y hormonas de la planta, ocurriendo

	esa competencia cuando cada inflorescencia cuaja tres o más frutos.
Valencia y Téliz, (2007)	Se desconoce aún la causa de este problema, pero se ha asociado a varios hongos como <i>Dothiorella</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Pestalotia</i> sp., <i>Hyalodendron</i> sp., <i>Sthempphyllum</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., y <i>Glomerella</i> sp., así como algunas bacterias <i>Pseudomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Corynebacterium</i> . Ocasionalmente se ha encontrado que <i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Helminthosporium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Diplodia</i> sp., <i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>Phomopsis</i> sp., llegan a provocar lesiones en el pedicelo. Sin embargo, no se ha comprobado.
Cervantes <i>et al</i> , (2016)	Trabajaron con aislados de bacterias endófitas de frutos de aguacate con síntomas de abscisión, colectados en la franja aguacatera del estado de Michoacán, obteniendo 36 cultivos bacterianos de cubierta seminal de frutos sintomáticos y asintomáticos, donde caracterizaron fenotípicamente los géneros <i>Pantoea</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Burkholderia</i> y coriniformes, y mediante caracterización molecular se logró la identificación de <i>Pantoea</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Empedobacter</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Bacillus</i> .
Soto <i>et al</i> , (2021)	Reportan que en Chile la pudrición peduncular afecta los frutos hasta en un 40 %, factor que ha sido asociado a la presencia de hongos fitopatógenos pertenecientes a la familia <i>Botryosphaeriaceae</i> , afectan la base del pedúnculo del fruto y la enfermedad se caracteriza por una pudrición que surge en la unión que existe entre el

	fruto y el pedúnculo, la cual avanza a través de los haces vasculares a medida que la fruta madura.
--	---

2.4. Pasos requeridos para la identificación de hongos

Se dice que la mayoría de las enfermedades de las plantas pueden diagnosticarse sólo con ser observadas, sin embargo, existen varias enfermedades fungosas y bacterianas en las que es imposible identificar el patógeno, o a que la enfermedad es causada por un patógeno desconocido hasta ese momento, razón por la que los patógenos de enfermedades desconocidas deberán de aislarse a partir de los tejidos enfermos de la planta, para su posterior identificación tanto morfológica como molecular (Agrios, 2013).

2.5. Características generales de los hongos asociados a la pudrición del pedúnculo de fruto del aguacate.

2.5.1. *Alternaria* sp.

El género *Alternaria* fue establecido en 1817 por Nees con *A. alternata* conocida originalmente como *A. tenuis* como la especie tipo. De acuerdo con M.B. Ellis (1971,1976), este contenía 44 especies. Un número diferente de especies ha sido establecido por otros taxónomos, principalmente combinando varias especies existentes en una o dividiendo una especie en varias. Las especies saprofitas de *Alternaria* son involucradas en la degradación de desechos vegetales y otros productos Rotem (1994).

Alternaria es un género perteneciente a la familia Dematiaceae, del orden Hyphomycetos perteneciente a los hongos imperfectos.

El género *Alternaria* sp., es uno de los más representativos ya que dentro de este se encuentra una enorme cantidad de especies, las más conocidas son las parasitas y patógenas de una gran variedad de plantas, todos los taxones identificados en su mayoría pueden ser aislados y mantenidos en medio de cultivo artificial, todas las especies pueden ser inducidas a esporulación bajo condiciones simples de laboratorio. *Alternaria* sp., es considerada como una de las categorías que comprende el mayor número de

especies de dematiaceos Hyphomycetes, sus conidios son septados muriformes los cuales se desarrollan en sitios restringidos del ápice distintivo de los conidióforos siendo estos pigmentados, los conidióforos son distinguidos en macronematosos los cuales morfológicamente son diferentes por lo general son más anchos y oscuros que la hifa vegetativa de la que surgen y mononematosos es decir solitarios o cespitosos, desarrollándose como individuos libres o pudiendo llegar a surgir como grupos sueltos a partir de una base en común (Simmons, 2007).

Por su parte la esporulación en medio de cultivo regularmente es en los ejes aéreos largos y pueden permanecer solitarios o desarrollarse como funículas, respecto con la elongación del conidióforo, es acroáxico es decir alargamiento a través del crecimiento apical y no del desarrollo continuo de las células basales, en cuanto a la morfología del conidióforo primario es subcilíndrico, variable en tamaño normalmente con uno o más transeptos, por lo regular con un agrandamiento ligero del ápice conidiógeno.

La morfología del conidióforo secundario es no ramificada o con una o inusualmente más ramas laterales, más no con múltiples ramas apicales o hinchazones que formen una cabeza de células conidiogénicas. Para la proliferación de conidióforos y células conidiogénicas se reporta como simpodial dando una apariencia geniculada, aunque el alargamiento del conidióforo inicial termina cuando la célula apical se vuelve conidiógena. Referente a la producción de conidios y células conidiógenas Campbell (1968) interpreto la relación como enteroblastica, con cada conidio originándose como una gemación de la pared secundaria interna de la punta del conidióforo y emergiendo a través de un poro en la pared primaria del conidiofóro, mientras que Carroll y Carroll (1971) interpretaron que la conidiogénesis en *Alternaria* es holoblástica, con todas las paredes de la punta del conidióforo brotando sin discontinuidad en las mismas capas de la pared del conidio juvenil (Simmons, 2007).

La forma del conidio es variada de subesferoide, ovoide, o elipsoide cuando es joven y en su madurez es de ampliaciones largas, cortas, anchas o estrechas, pero de las mismas formas, la septación dictiosa, muriforme con tabiques transversales y generalmente algunos longitudinales y oblicuos (raros o tardíos en algunas especies).

2.5.2. *Alternaria tenuissima*

Esta especie fue descrita por Simmons en 1995 quien reporta que las colonias pueden desarrollarse adecuadamente en medio PCA y V-8 entre los 5-7 días, pudiendo formar 2-3 pares de anillos concéntricos de crecimiento y esporulación mal definidos, la esporulación en trozos de agar se empieza a notar a los 2 días, en medio PCA se observa como una capa densa de conidios en cadenas de longitud moderada, su apariencia es ligeramente algodonosa, mientras que en V8 se puede ver una densa capa de cadenas no ramificadas de 6-8 conidios.

Su esporulación en superficies expuestas a la luz genera anillos de cadenas no aglomeradas de hasta 12 conidios en hifas ramificadas. Cubriéndose toda la colonia preferentemente en áreas aisladas por la luz se puede encontrar un desarrollo muy ramificado algunas veces con mechones de hifas de cadenas conidiales simples o ramificadas de longitud moderada (Simmons, 2007).

El patrón de crecimiento en agar V8 es el mismo a excepción que la esporulación en áreas expuestas a la luz está densamente poblada.

El agar V8 fue usado en estudios anteriores como el primer medio de comparación de miembros de especies del grupo de *A. tenuissima*. Diferencias en morfología de conidios por especies componentes son acentuadas en este medio. El uso de PCA para comparación dentro de este grupo se le restó importancia porque el medio fomenta el desarrollo de la cadena tan rápido que hay una reducción general en el tamaño del conidio, con el resultado que la típica característica de *A. tenuissima* de conidios cónicos y septos medianos fuertes se vuelven de menor ocurrencia (Simmons, 2007).

En la figura 1 se pueden observar la formación de cadenas de conidios correspondientes a *A. tenuissima*.

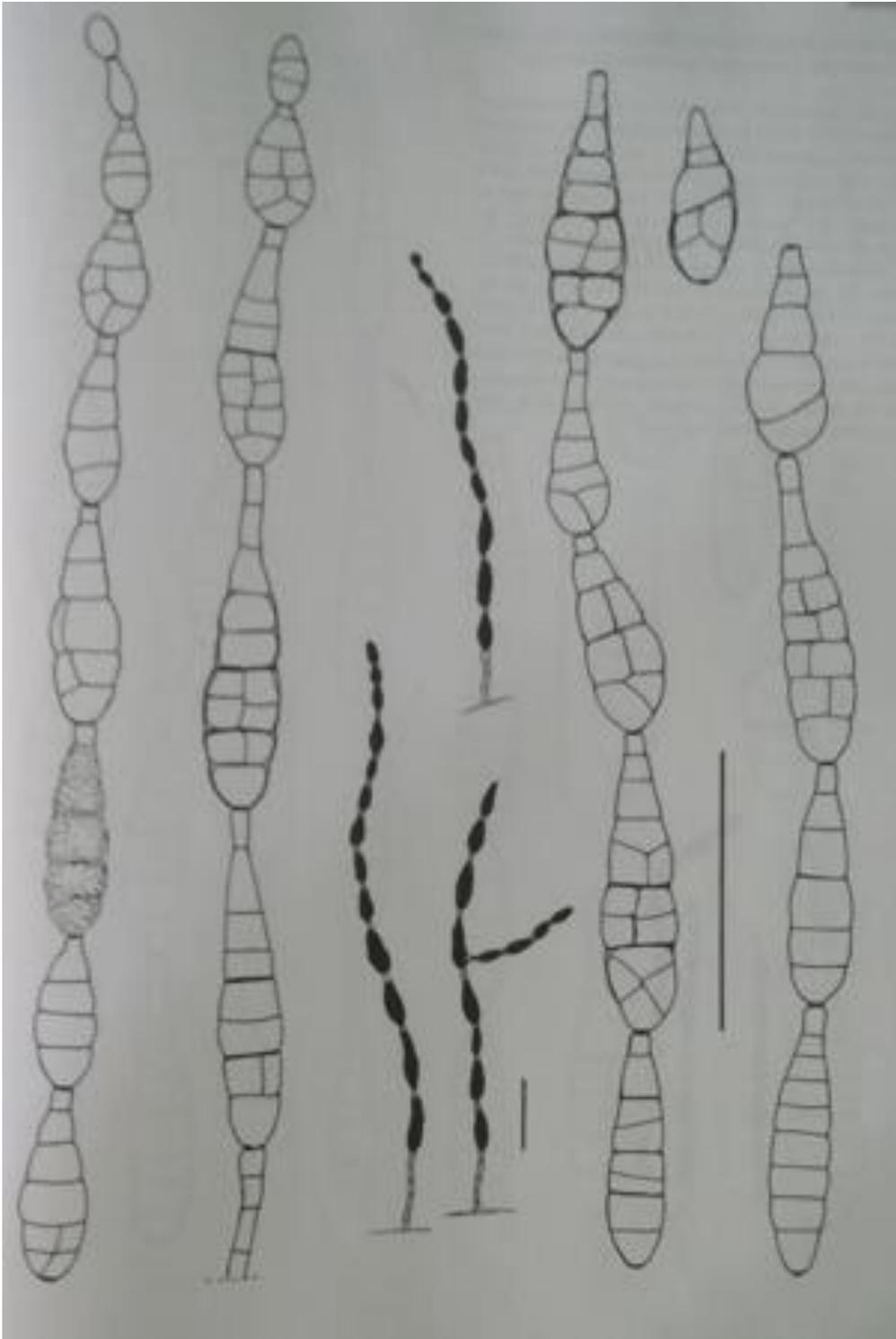


Figura 1. Patrón de esporulación de *A. tenuissima*, de Simmons (2007).

3.1.1. Identificación molecular de *Alternaria*

Se sabe que mediante el uso de ITS es posible la identificación molecular de *A. tenuissima*, ya que de acuerdo con Domínguez (2012), mediante la amplificación con ITS y β -tubulina logro afirmar de manera clara la identidad de de *A. alternata* y *A. tenuissima* como patógenos aislados de crisantemo obteniendo un % de identidad del 100% mediante ITS y el 99.8% de similitud con la amplificación del gen β -tubulina.

2.6. *Epicoccum* sp.

Sus especies son Ascomycetes, pertenecen al Phylum ascomicetos, de la familia Didymellaceae de Gruyter *et al*, (2009) y se pueden encontrar en varias partes de la planta, así como en agua y suelo Chen *et al* (2017), pudiendo ser endófitos, saprófitos o patógenos de plantas, considerándose a *Epicoccum* un género fúngico capaz de producir mico toxinas, algunas de sus especies actúan como agentes de control biológico frente a algunos patógenos de plantas (Taguiam *et al.*, 2021).

La clasificación taxonómica y sistemática del género *Epicoccum* sp., y de sus especies ha sido estudiada y descrita por Aveskamp *et al.*, (2010) y por Chen y colaboradores (2017), existen al menos 18 especies de *Epicoccum* asociadas a enfermedades en más de 46 especies de plantas y cinco especies de *Epicoccum* relacionadas al control biológico siendo una de las especies *E. nigrum* de mayor importancia en este rubro.

Existen especies synanamorfas, es decir que un hongo es capaz de producir múltiples anamorfos morfológicamente distintos, siendo el caso de *Epicoccum nigrum*, el cual se manifiesta en diferentes especies del género *Phoma*. De acuerdo con el sistema de clasificación de Boerema *et al* (2004), el género *Phoma* pertenece a los celomicetes este se encuentra dentro de la sección *Peyronellaea*, a su vez se divide en clados uno de ellos es el clado Didymellaceae en donde se encuentran reportadas la mayoría de las especies de *Phoma* así como varios hongos anamorfos como *Ampelomyces quercinus*, *Ascochyta fabae* (teleomorfo de *Didymella fabae*), *Ascochyta hordei*, *Ascochyta pinodes* (teleomorfo de *Didymella pinodes*), *Chaetasbolisia erysiphoides*,

Didymella exigua, *Epicoccum nigrum* (synanamorfo de *Phoma epicoccinia*) y *Microsphaeropsis olivacea* (Aveskamp *et al.*, 2010).

Las especies de *Epicoccum* se encuentran agrupadas en el grupo M, son especies formadoras de clamidosporas, sólo producen conidios unicelulares, de paredes delgadas y pseudoparenquimatosas compuestas por células isodiamétricas. Este grupo comprende tres especies que son acomodadas en la sección *Peyronellaea*, las especies de este grupo son *Phoma sorghina*, *Ph. pimprima* y *Epicoccum nigrum* este último basado en clamidosporas y siendo synanamorfo de *Ph. epicoccinia* (Aveskamp *et al.*, 2010).

2.6.1. Descripción morfológica de *Epicoccum nigrum*

De acuerdo con su clasificación taxonómica *Epicoccum nigrum* esta considerado como un sinanamorfo basado en clamidosporas de *Phoma epicoccinia* y se caracteriza principalmente por la producción de clamidosporas botrioides o epicocoides, presenta conidiomata pycnidial globosa o subglobosa de 50 a 250 µm de diámetro en la superficie de agar o sumergido en su mayoría solitario pero al inicio concurrido. Presenta ostiósolos papilares o en cuellos pronunciados, su pared conidial es pseudoparenquimatosa con dos a ocho capas celulares de las cuales de la primera a la tercera capas externas son pigmentadas de color marrón a oliva. Posee células conidiogénicas fialídicas, hialinas, lisas, simples de ca 3 – 7 × 3 – 7 µm (Aveskamp *et al.*, 2010).

Los conidios procedentes de la conidiogénesis son de forma variable siendo hialinos inicialmente y en etapas posteriores se puede tornar a una pigmentación color pardusca, de paredes delgadas, lisas siempre aseptadas de 3 – 8.5 × 1.5 – 4 µm, sus clamidosporas son unicelulares o multicelulares siendo intercalares o terminales, lisas verrugosas o tuberculosas, subhialinas a marrón oscuro, cuando son globosas unicelulares sus medidas son de 5-15 µm de diámetro y cuando son multicelulares globosas o de forma irregular, lisas, verrugosas o tuberculosas miden de 8 a 35 µm (Aveskamp *et al.*, 2010).

La figura 2 muestra las estructuras de algunas especies correspondientes al género *Epicoccum*.

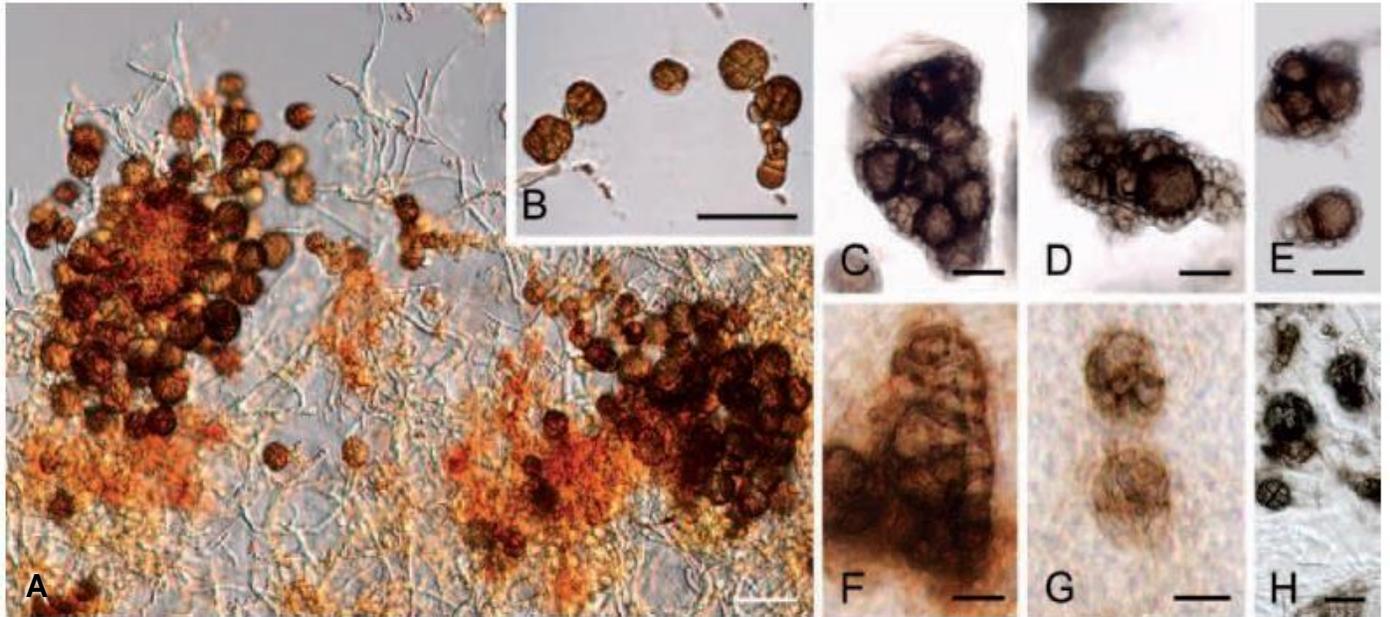


Figura 2. Estructuras morfológicas de especies del género *Epicoccum* sp., de (Aveskamp et al., 2010). *Clamidosporas globosas* de *Epicoccum* spp. A-B (CBS 173.73), C-E. *E. sorghi* (CBS 246.60) F-H. *E. pimprinum* (CBS 179.80). Barras de escala: A-B= 50 μ m; C-H= 20 μ m.

2.6.2. Daños reportados en cultivos por *E. nigrum*

Se ha reportado a *Epicoccum nigrum* como un hongo benéfico capaz de ser utilizado en el control biológico, sin embargo, este puede actuar tanto de manera benéfica como patógena, Chen y colaboradores (2017) reportaron a *E. nigrum* como patógeno aislado en diferentes cultivos afectando semillas, tallos, hojas y frutos, siendo la mancha de la hoja la característica principal de la enfermedad causando lesiones en cultivos como algodón, arroz, leguminosas y recientemente se ha reportado como el causante de la enfermedad en tallos de la fruta del dragón (*Hilocereus undatus*).

Epicoccum nigrum causa manchas marrones, así como pudriciones en frutos de tamaño pequeño volviéndolos necróticos (Lin et al., 2018), en el cultivo de melón se tiene reportado como el causante de la descomposición postcosecha de los frutos los cuales se caracterizan por presentar coloraciones rojizas, esta información ya había sido dada

a conocer desde 1993 por Bruton quien menciona que *E. nigrum* causa descomposición de frutos en poscosecha observando que estos presentaban síntomas de coloración roja (Taguiam *et al.*, 2021).

Lin *et al.*, (2015) han reportado a *E. sorghinum* como causante de la hoja retorcida en caña de azúcar, manchas foliares en el cultivo de col, este patógeno es capaz de infectar especies que no son de cultivo y que compiten por espacio, agua y nutrición, ya que en el 2017 se observó que *Dagitaria sanguinalis* la cual es una maleza cosmopolita que invade cultivos de cosecha de otoño y hortalizas presentó manchas foliares en más del 70% de sus hojas, razón por la cual se aisló tejido enfermo y los patógenos obtenidos se identificaron morfológica y molecularmente encontrando como resultado a *E. sorghinum*, molecularmente se emplearon los ITS, actina y β - tubulina , ambas secuencias fueron comparadas con datos del Gene Bank mostrando una identidad del 99 al 100% con los tres marcadores (Kang *et al.*, 2019).

De acuerdo con Andersen *et al.* (2009), las especies del género *Epicoccum* sp., son consideradas como patógenos débiles. Sin embargo, en frutos de diversas especies infectadas por este patógeno muestran descomposición o podredumbre y dependiendo de las condiciones ambientales la clorosis alrededor de la lesión marrón puede ser notoria, algunas colonias de *Epicoccum* sp., son capaces de provocar síntomas sin necesidad de un punto de entrada llámese herida o lesión.

2.6.3. Identificación molecular de *Epicoccum*

Son pocos los estudios que se tienen sobre este género por lo que es importante hacer uso de la identificación mediante marcadores moleculares. De acuerdo con Santos *et al.* (2018), al trabajar con hongos endófitos del género *Epicoccum* el análisis del DNA fue determinado con base en la secuenciación del gen β - tubulina, las secuencias en estudio fueron comparadas con otras secuencias obtenidas del GenBank señalando que a su vez se realizó un análisis filogenético, con base a la secuenciación del gen β - tubulina, se describe que *Epicoccum nigrum* puede considerarse como un complejo de especies ya que sus resultados revelan la presencia de dos grupos a pesar de ser identificados como

E. nigrum de acuerdo con la comparación de secuencias reportadas por el GenBank, corresponde a especies distintas considerando a *E. nigrum* como un grupo de especies criptas, por lo que se sugieren estudios más profundos, siendo así el uso de análisis multigenico.

Así mismo, Aveskamp y colaboradores (2010) en su trabajo sobre aspectos destacados de *Didymellaceae* intentaron establecer límites genéricos que permitieran tener claridad sobre la subdivisión del género *Phoma*, por lo que realizaron múltiples análisis utilizando secuencias obtenidas de 28S nrDNA, 18S nrDNA, las regiones espaciadoras transcritas internas 1 y 2 y 5.8S nrDNA y parte de la región del gen β - tubulina, revelaron que el género es ampliamente polifilético por lo que estos marcadores le proporcionaron la resolución a nivel de especie principalmente.

2.7. Identificación morfológica del género *Cladosporium* sp.

El género *Cladosporium* comprende un gran número de hongos dematiáceos encontrándose ampliamente distribuido alrededor del mundo comúnmente este hongo se considera como cosmopolita con mayor presencia en la atmósfera, frecuentemente es aislado como contaminante, algunas especies son patógenas. El género *Cladosporium* fue reportado por Link en 1816 siendo uno de los más heterogéneos en los hifomicetos, comprende más de 189 especies muchas de estas son conocidas por ser patógenas de plantas ocasionando manchas foliares y otras lesiones, algunas especies son consideradas como endófitos comunes (Pinheiro *et al.*, 2017).

2.7.1. Descripción morfológica de *Cladosporium* sp.

Los hongos pertenecientes a este género son denominados dematiáceos, por lo general son melanizados o negros ya que de manera natural son de color marrón causado por el pigmento melánico (dihidroxinaftalenomelanina) de su pared celular, este elemento ha sido considerado como un factor de virulencia ya que protege a los organismos de estrés ambiental.

En su fase saprófita forma hifas septadas y oscuras, posee conidióforos laterales y terminales de longitud variable verticales en cuanto a sus ramificaciones cercanas al ápice, capaz de producir cadenas largas y ramificadas de conidios ovoides de paredes lisas y finas de manera arbórea. La ramificación se lleva a cabo donde un conidio produce dos brotes en vez de uno, los blastoconidios pueden llegar a tener cicatrices oscuras en disyunciones o hilos que se alejan del conidióforo o bien de otros conidios.

Los conidios pueden producirse en cadenas de manera catenulada y solitarios en algunas especies donde los conidios son más largos, algunas veces llegan a ramificarse en cadenas acropleurógenas, son simples de forma cilíndrica, ovoide, doliforme, fusiformes, elipsoides, esféricos o subesféricos, de coloración marrón oliva oscuro, la superficie de los conidios puede ser lisa, verrugosa o equinulada pudiendo tener de 0 a 3 septos.

Son considerados hongos de crecimiento lento, alcanzando su madurez entre los 14-21 días, se caracterizan por la formación de colonias puntiformes (crecen como pequeños agregados de puntos entre sí), de superficies planas aterciopeladas circulares, de coloración verde oliva hasta el marrón oscuro y en la parte posterior de color negro (Pinheiro *et al.*, 2017).

2.7.2. Características morfológicas de *Cladosporium cladosporioides in vivo*

Las colonias pueden llegar a ser de color verde grisáceo, oliváceo o parduzco, por lo general el micelio se encuentra adherido al sustrato, conidioforos erectos, solitarios, largos por lo general sin ramificar, una vez ramificado con medidas de 10-250 μm \times 2.5-6 μm por lo general menor a 100 μm , aseptado a pluriseptado liso u ocasionalmente rugosos de paredes delgadas de 1-1.5 μm .

Presenta conidios en cadenas ramificadas subglobosos, elipsoide a ovoide de 3-4 a 8-11 \times 2-4 μm septados y en ramoconidios, septados subhialinos de color oliváceo pálido a pardo oliváceo, conidios de paredes delgadas \leq 1 μm de extremos atenuados a redondeados de 0.5-2.5 de diámetro, conidios en cadenas ramificadas siendo subglobosos elipsoides a ovoides de 3-11 \times 2-5 μm . Posee ramoconidio secundario

elipsoide subcilindrico a cilindrico de $8-30 \times 2.5-5.5 \mu\text{m}$ pudiendo ser septado subhialino u olivaceo a marrón (Bensch *et al.*, 2012).

2.7.3. Características morfológicas de *Cladosporium cladosporioides in vitro*

Micelio inmerso raramente superficial, hifas escasas sin ramificar o moderadamente de $1-5 \mu\text{m}$ de ancho septado, con septos ocasionalmente oscuros subhialinas de color marrón olivaceo palido a marrón palido lisas a verruculosas o de paredes rugosas. Conidioforos solitarios macronematosos o semimacronematosos en ocasiones micronematosos surge terminalmente de la hifa ascendente o lateralmente de hifas plagiotróficas, estrechamente cilíndrico a cilíndrico oblongo, en ocasiones filiforme algunas veces geniculado de $40-350 \times 2.5-5.5 \mu\text{m}$ sin ramificar ocasionalmente ramificado siendo por lo general cortas en forma de clavija de crecimiento lateral justo debajo de un septo ocasionalmente de hasta $60 \mu\text{m}$. Los septos en ocasiones son ligeramente constreñidos y alguno de los septos superiores ligeramente de coloración oscura en donde se forman los ramoconidios siendo de color marrón a olivaceo suave a verruculosa especialmente hacia la base la cual ocasionalmente aparece hinchada de hasta $7 \mu\text{m}$ de ancho micronematoso.

Conidióforos más cortos y estrechos palidos y sin ramificar de $9-150 \times 1-3 \mu\text{m}$ de ancho. Células conidiógenas integradas generalmente terminal o en ocasiones intercalar justo debajo de un tabique no geniculado de $7-38 \mu\text{m}$ de largo protuberante de $1-2.5 \mu\text{m}$ de diámetro. Los ramoconidios pueden separarse en alguna de las partes superiores de septos oscurecidos siendo rectos a ligeramente curvados, cilíndricos u oblongos de $15-50 \times 2.5-5 \mu\text{m}$ con tres septos de color oliva a marrón en las puntas de los conidióforos.

Numerosos conidios catenados, cadenas largas ramificadas siendo hasta 10 conidios en la parte superior no ramificada con ramificaciones en todas direcciones, teniendo conidios pequeños terminales subglobosos, obovoide, ovoide a limoniforme de $3-7 \times 1.5-3 \mu\text{m}$ aseptado. Los conidios intercalares son por lo general limoniformes, elipsoide-ovoide, a veces fusiforme o subcilíndrico de $5-14.5 \times 2-4 \mu\text{m}$ aseptado (Bensch *et al.*, 2012), en la Figura 3 se pueden observar las ramificaciones de conidios de *C. cladosporioides*.



Figura 3. Estructuras morfológicas de *Cladosporium cladosporioides*, de Bensch et al, (2012). *Cladosporium cladosporioides* (CBS 112388). A-F. Conidioforos macronematosos y cadenas de conidios. Barras de medida= 10 μ m.

2.7.4. Características del medio de cultivo

Las colonias establecidas en medio PDA tienden a ser de color gris oliváceo a verde opaco, gris oliva, gris plomizo o negro oliváceo, aterciopelado a flocoso con margenes gris oliváceos a blanco, plumoso, micelio aéreo escaso, difuso a veces abundantemente formado, denso, flocoso-fieltro, de crecimiento plano a convexo bajo, ocasionalmente con varios exudados pequeños prominentes.

Cladosporium cladosporioides es una de las especies saprofitas más común con distribución mundial actuando con frecuencia como invasor secundario en partes

necróticas de muchas plantas huésped, aislados del aire, suelo, entre otros sustratos y encontrado como hongo endófito común (Bensch *et al.*, 2012).

2.7.5. Identificación molecular del género *Cladosporium*

Aunque los ITS han demostrado ser de utilidad para la distinción de la mayoría de especies del género *Cladosporium*, muestran una resolución limitada para algunas especies, se dice que los ITS es un locus adecuado para la identificación de un aislado a nivel de género y en cierta medida de algunos complejos específicos, se señala que se requieren locis adicionales para lograr una identificación precisa a nivel de especie.

Algunos códigos de barras (secuencias de ADN mitocondrial utilizada para medir distancia genética entre poblaciones) recomendados para la identificación molecular de *Cladosporium* son los actina (*act*) y el factor de elongación 1-alfa (*tef1*), los análisis filogenéticos con ambos loci son capaces de diferenciar las especies de *Cladosporium* aceptadas hasta el momento dentro del género (Bensch *et al.*, 2012).

2.8. Importancia de la identificación molecular en hongos

Para la identificación molecular de hongos es necesario antes que nada realizar la extracción del ADN siguiendo protocolos de extracción de ácidos nucleicos para hongos, obteniendo cantidades de ADN genómico puro, el cual es adecuado para el análisis de enzimas de restricción y algunas otras aplicaciones moleculares, sólo pequeñas cantidades de ADN son requeridas para realizar la amplificación mediante PCR usando primers específicos (Edel, 1998).

2.9. ITS (Espaciador transcrito interno)

Los ITS consisten prácticamente en dos regiones no codificantes las cuales se encuentran dentro de las repeticiones del rADN entre la subunidad pequeña altamente conservada, la subunidad 5.8S y los genes del rARN de la subunidad grande. Los ITS son particularmente útiles en el área de la caracterización molecular en estudios de hongos por cuatro razones principales: 1) las regiones de los ITS son relativamente cortas (500-800 pb) por lo que pueden ser fácilmente amplificadas mediante PCR utilizando

pares de primers únicos universales que son complementarios a las regiones conservadas dentro de los genes de la subunidad rARN, 2) las multicopias naturales de la repetición del rDNA facilita la amplificación de la región ITS a partir de muestras de ADN pequeñas, diluidas o altamente degradadas, 3) la región de los ITS puede ser altamente variables entre especies morfológicamente distintas por lo tanto los datos de restricción de RFLP generados por ITS pueden ser usados para calcular distancias genéticas y proporcionar caracteres para el análisis sistémico y filogenético, 4) las sondas específicas de especies ITS generadas mediante PCR se pueden producir rápidamente, sin necesidad de producir una biblioteca cromosómica, por lo que varios investigadores han seleccionado secuencias de la región ITS para desarrollar sondas específicas de especies porque las secuencias ocurren en múltiples copias y tienden a ser similares dentro de las especies de hongos y variables entre ellas (Bridge y Arora, 1998).

2.10. Postulados de Koch

Son utilizados para evaluar la patogenicidad de los microorganismos, lo cual permite conocer la evolución de la enfermedad, así como comprobar de manera precisa la patogenicidad atribuida a un organismo viviente. Dichos postulados fueron establecidos por Robert Koch (1843-1910) con la finalidad de encontrar (una causa: una enfermedad), por lo que se establece en primer lugar la necesidad de asociar un agente biótico a un hospedero enfermo para proceder de manera posterior a su aislamiento en cultivo *in vitro*, seguido de su caracterización. Una vez lograda la etapa de aislamiento bajo condiciones asépticas la inoculación de los propágulos de dicho microorganismo es necesaria para su inoculación en un hospedero sano con la finalidad de reproducir la sintomatología de la enfermedad, para que finalmente los dos aislamientos del agente biótico coincidan con sus características morfológicas encontradas en un inicio (Barnes, 2000; Volcy 2008).

2.10.1. Importancia de los postulados de Koch

Dichos postulados son necesarios para dar una solución a la causalidad de las enfermedades, ya que permiten hacer una relación entre el agente biótico con el hospedero enfermo para así poder llevar a cabo el aislamiento del microorganismo considerando su identificación para su posterior inoculación y replicación, por lo que su finalidad es que los dos aislamientos del agente biótico tanto natural y cultivado deberán ser semejantes en sus caracteres tanto morfológicos como biológicos (Volcy 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Estado de México cuenta con 11,296 ha establecidas de aguacate variedad 'Hass', mismas que se ven afectadas por la caída de frutos causada por el anillamiento de pedúnculo disminuyendo hasta un 40% la producción, sin embargo, se desconoce su etiología, lo cual dificulta establecer estrategias para su manejo.

4. JUSTIFICACIÓN

El anillamiento de pedúnculo (AP) en frutos de aguacate 'Hass' es considerado como uno de los cinco problemas mayores a los que se enfrenta el productor y que se manifiesta en una caída de frutos en la etapa inicial de su desarrollo con una caída que afecta hasta el 40 % de la producción después del amarre. A pesar de este problema se tienen establecidas 11,296.00 ha de esta variedad en el Estado de México, razón por la que los productores se ven afectados en el rendimiento del cultivo.

Investigaciones relacionadas con esta problemática reportan el aislamiento de microorganismos como hongos y bacterias. Sin embargo, señalan no haber tenido éxito en sus pruebas de patogenicidad, continuando como una enfermedad de etiología desconocida. Por lo que es necesario aportar conocimientos sobre el agente causal de esta enfermedad que permita desarrollar medidas de manejo asertivas y sostenibles.

5. HIPÓTESIS

El anillamiento de pedúnculo que se presenta en frutos de aguacate var. 'Hass', y que ocasiona la caída del fruto, puede ser causado por un complejo de microorganismos fitopatógenos de origen fúngico.

6. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar los hongos patógenos asociados al anillamiento del pedúnculo de frutos de aguacate var. 'Hass' provenientes de tres municipios del Estado de México.

6.1. Objetivos específicos

- ❖ Aislar hongos de pedúnculos de frutos de aguacate que presentan lesiones por anillamiento.
- ❖ Identificar morfológicamente a nivel de especies, a los hongos aislados haciendo uso de claves taxonómicas y literatura especializada.
- ❖ Identificar molecularmente a los hongos fitopatógenos mediante marcadores ITS y del gen β -tubulina.
- ❖ Realizar pruebas de patogenicidad mediante los postulados de Koch *in vitro* y *ex vitro*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Colecta del material sintomatológico

La colecta de los frutos con tejido vegetal enfermo se realizó en tres huertos comerciales del Estado de México (Cuadro 2). Para la colecta de frutos de aguacate variedad 'Hass' se consideraron, a aquellos que presentaban la sintomatología típica del anillamiento, inicios de la necrosis en el anillo del pedúnculo, así como manchas purpuras o rojizas en el pericarpio del fruto.

La colecta se realizó en la última semana del mes de mayo y la primera del mes de junio de 2021, se colectaron 30 frutos de tamaño aceituna por municipio. El material vegetal (fruto) colectado fue trasladado en frío al laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo (18°58'05.96" N y 99°36'48.11" O a una altura de 2060 msnm) ubicado sobre carretera federal Tenancingo – Villa Guerrero km 1.5, Estado de México en donde se realizó el aislamiento y purificación de los hongos obtenidos del material vegetal.

Cuadro 2. Municipios del Estado de México en donde se realizó la colecta del material vegetal.

Municipio	Huerta	Manejo	Coordenadas
Donato Guerra	San Juan	De riego	19°18'43.18" N y
	Xoconusco		100°15'16.49" O 2052 msnm
Coatepec Harinas	San Martín el Salto	Dos riegos por temporada	18°57'03.43" N y 99°47'45.72" O 2460 msnm
	Malinalco		San Sebastián

7.2. Procesamiento de las muestras

7.2.1. Aislamiento

El trabajo de aislamiento consistió en desprender los pedúnculos de cada fruto colectado de los diferentes municipios con los síntomas característicos de anillamiento de pedúnculo. Este proceso se realizó siguiendo la metodología de aislamiento de microorganismos propuesto por Agrios (2013), por lo que se les realizaron cortes de aproximadamente 0.5 cm, dichos trozos fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto continuando con tres enjuagues de agua destilada estéril y se colocaron en papel secante estéril para eliminar el exceso de humedad, posteriormente, fueron sembrados cinco trozos de pedúnculo en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA de la marca BD Bioxon) (39 g/L) las cuales se sellaron con parafilm obteniendo un total de 90 cajas de Petri de los frutos colectados, cada caja fue etiquetada con el sitio de la colecta, y fecha de siembra, fueron incubadas a ± 25 °C bajo condiciones de laboratorio (Figura 4).

El monitoreo del crecimiento de los hongos se hizo diariamente, una vez que aparecieron las colonias de hongos se realizaron cultivos puros, de cada colonia se tomó un fragmento de medio de cultivo con micelio del hongo y se transfirió a nuevas cajas de Petri con medio PDA dándoles las mismas condiciones de incubación hasta observar el crecimiento y esporulación de cada hongo. Para finalizar, se llevaron a cabo cultivos monospóricos a partir de las colonias puras de acuerdo con Crous *et al.* (2009).

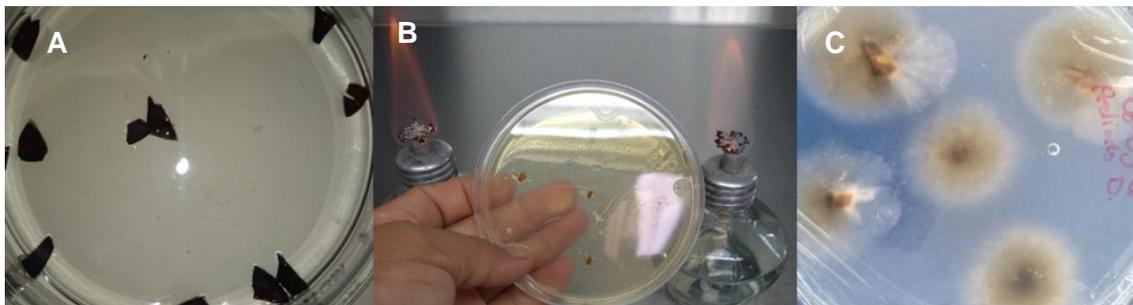


Figura 4. Proceso de desinfección y siembra de tejido vegetal enfermo; A) Desinfección y enjuague de pedúnculos para el aislamiento de patógenos. B) Siembra de cortes de pedúnculo en cajas de Petri con medio de cultivo PDA y C) aparición de hongos a partir de tejido vegetal sembrado.

7.2.2. Cultivos monospóricos

A cada colonia pura y esporulada se le agregaron 10 mL de agua destilada estéril, con ayuda de una aza bacteriológica – micológica estéril se realizó un raspado a cada colonia con la finalidad de desprender las esporas, el producto obtenido del raspado se recuperó con micro pipeta y se depositó en tubos de cultivo previamente esterilizados recuperando los 10 mL de agua destilada estéril y las esporas producto del raspado obteniendo así la suspensión madre, en seguida en un nuevo tubo con 9 ml de agua destilada estéril se le agrego un mL de la suspensión madre y se agito con ayuda de un vortex (GENIE ®), las diluciones se hicieron a una concentración 10^{-3} con la finalidad de tener la menor cantidad de esporas posibles y así facilitar su visualización.

De la dilución obtenida 10^{-3} se tomaron 100 μ L y se depositaron en cajas de Petri con medio PDA la suspensión de conidios se dispersó en toda el área de la caja, se incubaron en oscuridad durante 24 h, este procedimiento se realizó a los tres hongos en estudio (*Alternaria* sp., *Epicoccum* sp. y *Cladosporium* sp.).

A las 24 horas las cajas de Petri fueron observadas bajo la lupa de un contador de colonias (Felisa ®) para buscar las esporas germinadas de cada hongo, de manera individual fueron transferidas a nuevas cajas de Petri con medio de cultivo. En el caso de *Alternaria* sp., las esporas fueron transferidas a cajas de Petri con medio PCA (agar-papa-zanahoria, 20 g de cada uno / L de agua destilada) se colocaron en cámara de incubación a temperatura de 25 ± 2 °C, dándole fotoperiodo con luz blanca de 17 W en periodos de 16 h luz y 8 h de oscuridad durante 5 a 7 días, el crecimiento de las colonias se revisó cada 24 h marcando el crecimiento diario de estas con marcador indeleble (Rodrigues *et al.*, 2010: Domínguez 2012).

La misma metodología de transferencia de esporas individuales se utilizo para *Epicoccum* sp. y *Cladosporium* sp., sólo que las esporas fueron transferidas en cajas de Petri con medio PDA, en el caso de *Cladosporium* sp., no fue necesario darle condiciones específicas por ser un hongo que presenta buena esporulación, se incubo a temperatura ambiente bajo condiciones de laboratorio por un periodo de 20 días, Bensch *et al.* (2012)

reportó al medio PDA como uno de los medios de cultivo idóneos para el crecimiento de *Cladosporium* sp.

Mientras que a *Epicoccum* sp., fue necesario brindarle condiciones de luz blanca continua de 17 W por un lapso de 12 días en condiciones de laboratorio a ± 25 °C para favorecer la esporulación del hongo. Una vez que se les brindaron las condiciones específicas de medio de cultivo, luz y temperatura a cada hongo, inició su desarrollo y se hicieron mediciones cada 2 días para poder determinar la tasa de crecimiento de las colonias. Así mismo, mediante cámara Neubauer se realizó el conteo de conidios de cada colonia (Figura 5).

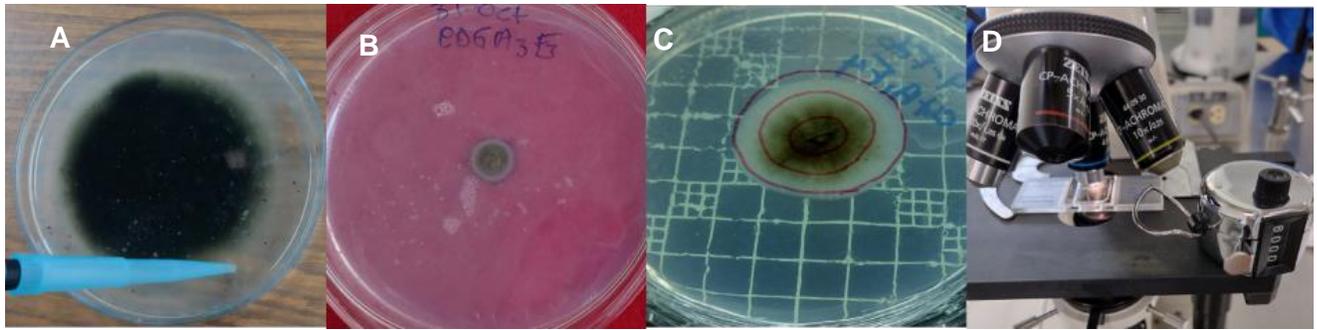


Figura 5. Proceso de obtención de colonias monospóricas. A) Recolección de esporas mediante micropipeta, B) Crecimiento de colonias monospóricas, C) Medición de crecimiento de las colonias y D) Conteo de conidios en cámara Neubauer bajo microscopio.

7.3. Identificación morfológica de los hongos

Para la identificación de los hongos encontrados en los aislados de aguacate, a nivel de género se consideraron las claves taxonómicas de Barnett y Huntter (1998) y se realizó con base en su morfología y características culturales: como color de micelio y tipo de crecimiento sobre el medio de cultivo, así como forma de conidios y tipo de micelio (septado o aseptado), coloración de las estructuras morfológicas.

Para la identificación de especie, se utilizaron las colonias obtenidas en los cultivos monospóricos tratadas con las condiciones de luz y temperatura específicos para cada hongo, para la identificación a nivel de especie de *Alternaría* se utilizaron las claves

descritas por Simmons (2007), mientras que para *Epicoccum* sp., la identificación a nivel de especie fue mediante las claves propuestas por Aveskamp *et al.* (2010) y para *Cladosporium* sp., se utilizaron las claves establecidas por Bensch *et al.* (2012).

Las estructuras morfológicas (conidios, conidióforos, clamidosporas) fueron medidas en μm , se utilizaron preparaciones permanentes y temporales, se consideraron 30 mediciones para cada una de las estructuras, las cuales se midieron con reglilla micrométrica bajo microscopio óptico compuesto marca Axiostar plus®.

7.3.1. Identificación mediante análisis molecular (PCR)

En la identificación molecular se utilizaron cepas monoconidiales de cada uno de los géneros (*Alternaria*, *Epicoccum* y *Cladosporium*) de siete días de edad para la extracción del ADN, utilizando las regiones específicas ITS 4 y 5 y del gen β -tubulina 2a y 2b. La extracción del ADN se realizó con ayuda del kit comercial E.Z.N.A.® Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek), con la mezcla de reacción descrita en el Cuadro 3. Se verificó la presencia del fragmento mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, la tinción se realizó con bromuro de etidio (5 mg L^{-1}) y los geles se documentaron en el foto documentador Gel Doc (Bio-Rad, USA).

Se realizó la amplificación de las regiones internas de los genes ribosomales 18S–5.8S y 5.8S–28S con los cebadores universales ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) y del gen β -tubulina (Bt2a y Bt2b) (Cuadro 4). La mezcla de reacción y las condiciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador profesional estándar (Biometra, Alemania) en un volumen final de 25 μl , el programa de los ciclos de amplificación se describen en el Cuadro 5.

Cuadro 3. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR.

Solución (25 µl de volumen final)	Solución madre empleada	
	ITS	β – tubulina
Buffer	1 X	1 X
MgCl ₂	0.75 mM	0.75 mM
DNTPs	0.2 mM	0.2 mM
Primers	10 µM	10 µM
Platinum Taq- DNA polimerasa	1 U	1 U
DNA	80 ng	80 ng

Cuadro 4. Secuencia de los primers utilizados para la amplificación del DNA de los patógenos estudiados.

Primer	Secuencia
Region ITS	ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC)
White <i>et al.</i> , (1990)	ITS 5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)
Gen β- tubulina	β -t 2 a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC)
Glass y Donaldson (1995)	β -t 2 b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC)

Cuadro 5. Condiciones de los ciclos de amplificación mediante PCR.

Etapa	ITS			β -tubulina		
	Temp. °C	Tiempo	Ciclos	Temp. °C	Tiempo	Ciclos
Iniciación	96	3 min	1	96	3 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	35	95	30 seg	35
Alineación	55	30 seg	1	55	30 seg	1
Extensión	72	45 seg	1	72	45 seg	1
Extensión final	72	4 min	1	72	4 min	1

Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones (5'– 3' y 3'– 5') por el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit versión 7.0.0. (Hall, 1999), se alinearon con la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, EE. UU.).

7.4. Preparación de material vegetal e inóculo para las pruebas de patogenicidad

7.4.1. Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se partió de colonias monospóricas de los tres géneros en estudio. *Cladosporium* se preparó en cajas de Petri crecidas en medio PDA de 10 días de edad, el inóculo de *Epicoccum* fue preparado en cajas con 20 días de edad sembradas en medio PDA, *Alternaria* de 13 días de edad crecidas en medio PCA. Para las colonias de los tres géneros de hongos *Cladosporium*, *Alternaria* y *Epicoccum* se realizó un raspado a las colonias agregándoles 10 mL de agua destilada estéril y se llevaron a un volumen inicial de 50 mL, la suspensión se preparó a una concentración de 1×10^5 conidios por mL, dichas concentraciones se calcularon bajo microscopio con ayuda de un hematocitómetro.

Una vez obtenidas las suspensiones de conidios a las concentraciones requeridas estas fueron depositadas en atomizadores de 10 mL de capacidad para su aplicación.

7.4.2. Preparación del material vegetal (frutos) para la inoculación

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas en dos formas (una fase *in vitro* y una *ex vitro*), los frutos de aguacate var. "Hass" fueron colectados al azar en una huerta comercial del municipio de Malinalco, Estado de México, se seleccionaron frutos de apariencia sana, se midieron con un vernier para homogenizar el tamaño.

Los frutos seleccionados se cosecharon con pedicelo, una vez colectados se almacenaron en frío y se trasladaron al laboratorio, en donde se llevó a cabo el experimento, a los frutos se les hizo una desinfección con hipoclorito de sodio al 2%, posteriormente se les realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. Después de ser desinfectados, los pedicelos se introdujeron en tubos florales de plástico con ventosa con el objetivo de mantener hidratados los frutos, los cuales se llenaron con 10 mL de agua destilada estéril.

7.5. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado, con siete tratamientos más un testigo, cada tratamiento estuvo *integrado* por tres repeticiones de cinco unidades experimentales cada uno (frutos). La inoculación de los hongos (tratamientos) se realizó mediante aspersion con ayuda de un atomizador manual, inmediatamente después de la inoculación en los frutos las charolas de plástico se cubrieron con un domo transparente de plástico para evitar contaminación.

Los tratamientos fueron divididos en tres repeticiones de cinco frutos o unidades experimentales cada uno, se colocaron tres repeticiones por charola, cada repetición se sujetó en charolas de plástico (charola con base y domo transparente), una vez inmovilizados los tubos florales que contenían los frutos, con ayuda de una aguja de disección se punzó a los pedúnculos de los frutos provocando heridas, todo el proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo campana de flujo laminar, el procedimiento se representa en la Figura 6.

Las charolas con los diferentes tratamientos se colocaron en mesas de acero inoxidable y se mantuvieron en condiciones ambientales del laboratorio, se registró la humedad relativa y temperatura con un equipo data logger HOBO®.



Figura 6. Proceso de inoculación de patógenos en experimento in vitro A) Selección de frutos de apariencia sana, B) Establecimiento de las unidades experimentales, C) Provocación de heridas en el pedúnculo del fruto con ayuda de aguja estéril, D) Aspersión de conidios con micro aspersor a los frutos de aguacate, E) Sellado de los tratamientos con domo de plástico.

7.5.1. Variables evaluadas

Las variables evaluadas en las pruebas de patogenicidad fueron: incidencia, severidad, daño en pulpa, días a manifestación de síntomas y días a desarrollo de micelio.

La incidencia se registró en porcentaje, contabilizando el número de frutos que presentaron lesión (pudrición o apariencia corchosa en el pedúnculo) y se calculó mediante la siguiente fórmula. $I = \left(\frac{N \text{ de frutos enfermos}}{N^{\circ} \text{ total de frutos}} \right) * 100$ propuesta por Anculle y Álvarez (2006), donde I= porcentaje de incidencia, N= representa el número frutos que enfermaron del total inoculado, y N^o = total de frutos inoculados en el tratamiento.

La severidad se midió con base en una escala elaborada y propuesta con valores de 0 a 5 (Figura 7), para la obtención del porcentaje de severidad de acuerdo con los datos obtenidos según la clase a la que correspondió cada fruto se procesaron haciendo uso de la fórmula de Townsed y Heuberger (1943), $P = \left[\frac{\sum (n.v)}{N.C} \right] 100$ donde **P**= grado de severidad en %, **n**= número de muestras por categorías, **v**= valor numérico de cada categoría, **N**= número total de muestras y **C**= categoría mayor. La variable, días a aparición de síntomas fue el registro de los días a partir de la inoculación a la aparición de síntomas que se manifestaron por la coloración café en pedúnculo o algún cambio de coloración en fruto. Así mismo, los días a aparición de micelio fueron registrados contabilizando a partir del día de la inoculación al día de la manifestación de micelio visible en pedúnculo o fruto, el daño en pulpa se observó al momento de partir los frutos y se cuantifico mediante 1 y 0, donde 1= presencia y 0= ausencia, es decir la presencia o ausencia del daño manifestado en la pulpa, como manchas color café, puntos oscuros o descomposición total de la pulpa.



Figura 7. Escala de daño en frutos de aguacate var. 'Hass' propuesta para medir la severidad de la lesión en los frutos inoculados.

7.6. Re-aislamiento de los hongos inoculados

En los diferentes tratamientos se realizó un re-aislamiento para comparar las cepas obtenidas con las inoculadas inicialmente (último paso de los postulados de Koch), esto se realizó tanto en el experimento *in vitro* y *ex vitro*.

Del total de los frutos inoculados se procesó el 50 % de unidades experimentales por tratamiento, se consideraron frutos que desarrollaron los síntomas típicos del anillamiento, como pudrición o el aspecto corchoso de color café en el pedúnculo, así como la coloración rojiza a púrpura en frutos. Los pedúnculos seleccionados se cortaron en trozos de aproximadamente 2 a 3 mm y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se sembraron cinco trozos del material en cajas de Petri con medio PDA y se incubaron a temperatura ambiente,

una vez obtenidas las colonias se estudiaron sus características morfológicas y culturales comparándose con los aislamientos inoculados (López, 2021).

7.7. Prueba de patogenicidad *ex vitro*

Las pruebas de patogenicidad *ex vitro* se llevaron a cabo en un huerto comercial de aguacate var. 'Hass' ubicada en el municipio de Malinalco, con una edad de los árboles de 8 años. Se seleccionaron cuatro arboles con las mismas características de altura de árbol y tamaño de frutos, los frutos fueron seleccionados con características similares como tamaño y sanidad, se asignaron dos tratamientos por árbol.

Cada tratamiento consistió de tres repeticiones de cinco unidades experimentales cada uno, cada fruto fue una unidad experimental, los frutos fueron etiquetados con la fecha de inoculación, tratamiento y número de unidad experimental.

Los frutos fueron desinfestados previamente a la inoculación, con hipoclorito de sodio al 2% y agua destilada estéril desde el fruto hasta el pedicelo, inmediatamente se realizó la inoculación de los patógenos mediante aspersion de conidios con ayuda de un atomizador; el testigo únicamente se asperjo con agua destilada estéril, los frutos tratados fueron cubiertos con bolsas de papel celofán para evitar contaminación por agentes externos, no se provocaron heridas a los pedúnculos (Figura 8).

La conformación de los diferentes tratamientos estuvo determinada por la presencia de cada patógeno de manera individual y en convivencia, el Cuadro 6 muestra la conformación de cada uno de los tratamientos utilizados tanto para el experimento *in vitro* como *ex vitro*.

Cuadro 6. Patógenos involucrados en los diferentes tratamientos utilizados en el proceso de inoculación.

Tratamiento	Patógenos inoculados
1	<i>Alternaria</i> sp. + <i>Epicoccum</i> sp. + <i>Cladosporium</i> sp.
2	<i>Alternaria</i> sp. + <i>Epicoccum</i> sp.
3	<i>Alternaria</i> sp. + <i>Cladosporium</i> sp.
4	<i>Epicoccum</i> sp. + <i>Cladosporium</i> sp.
5	<i>Epicoccum</i> sp.
6	<i>Alternaria</i> sp.
7	<i>Cladosporium</i> sp.
8	Testigo (agua destilada estéril)

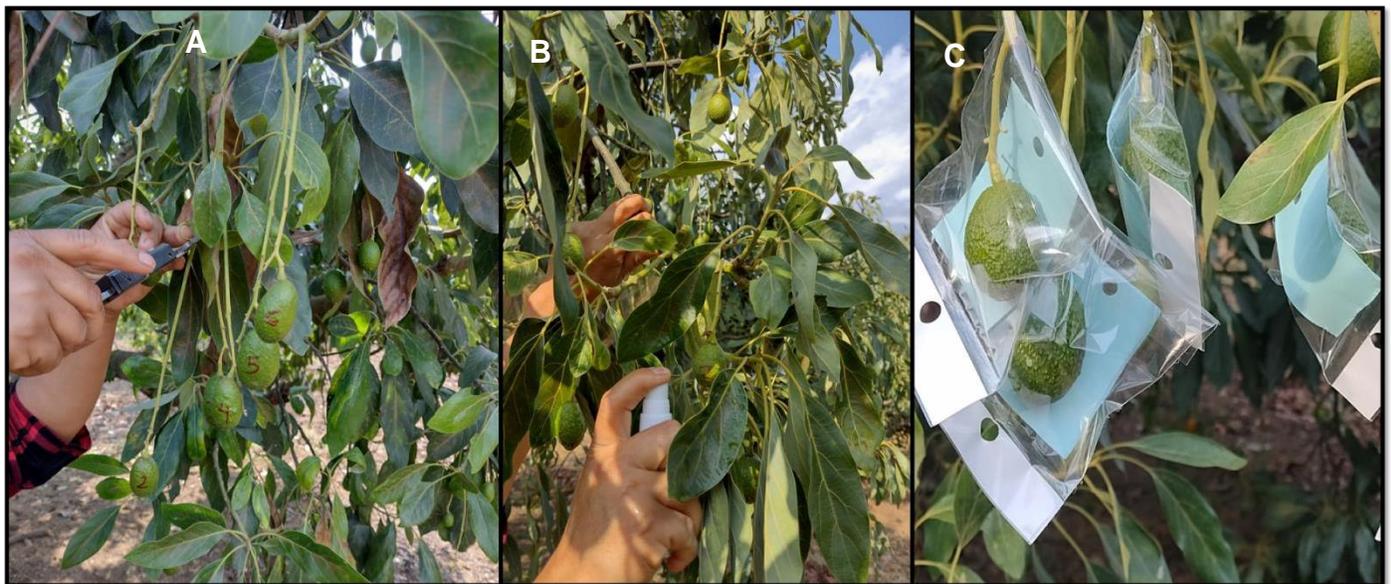


Figura 8. Inoculación de frutos ex vitro. A) Selección de frutos sanos y medición con vernier: B) Aspersión de conidios para la inoculación de frutos con los diferentes tratamientos: C) Protección de frutos inoculados cubiertos con bolsas de celofán para evitar contaminación.

7.8. Análisis estadístico

Los datos de las variables evaluadas se trabajaron mediante comparación de medias utilizando la prueba DCG ($p \leq 0.05$), los análisis estadísticos se corrieron en el programa InfoStat, Di Rienzo *et al.* (2020), los datos de la variable incidencia fueron transformados a $\arcsin \sqrt{\cdot}$ y las variables de severidad, días a manifestación de síntomas, daño en pulpa y días a aparición de micelio se transformaron a $\sqrt{\cdot}$, únicamente para la variable de severidad se trabajó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), finalmente el análisis de varianza se realizó por arreglo factorial en donde cada factor fueron los patógenos inoculados.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamientos

Los aislamientos a partir de los frutos colectados en los municipios de Coatepec Harinas, Donato Guerra y Malinalco, Estado de México generaron un total de 220 hongos aislados correspondientes a diversos géneros, con base en su morfología. Dada la diversidad de géneros para el desarrollo de la presente investigación fueron considerados los hongos que presentaron la mayor frecuencia y correspondieron a *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., y *Epicoccum* sp., ya que demostraron tener un porcentaje de frecuencia del 35.9, 20.9 y 20.4 % respectivamente, con relación al total de colonias obtenidas de las colectas de frutos en los tres municipios (Cuadro 7; Figura 9).

Cuadro 7. Porcentaje de frecuencia obtenida de hongos aislados a partir de las colectas de frutos realizadas en los municipios de Coatepec Harinas, Donato Guerra y Malinalco, Estado de México.

Género	% de colonias por género
<i>Alternaria</i> sp.	35.9
<i>Aspergillus</i> sp.	2.7
<i>Cladosporium</i> sp.	20.9
<i>Colletotrichum</i> sp.	2.2
<i>Epicoccum</i> sp.	20.4
<i>Verticillium</i> sp.	0.9
<i>Pestalotia</i> sp.	1.3
No identificados	12.2
Total	100

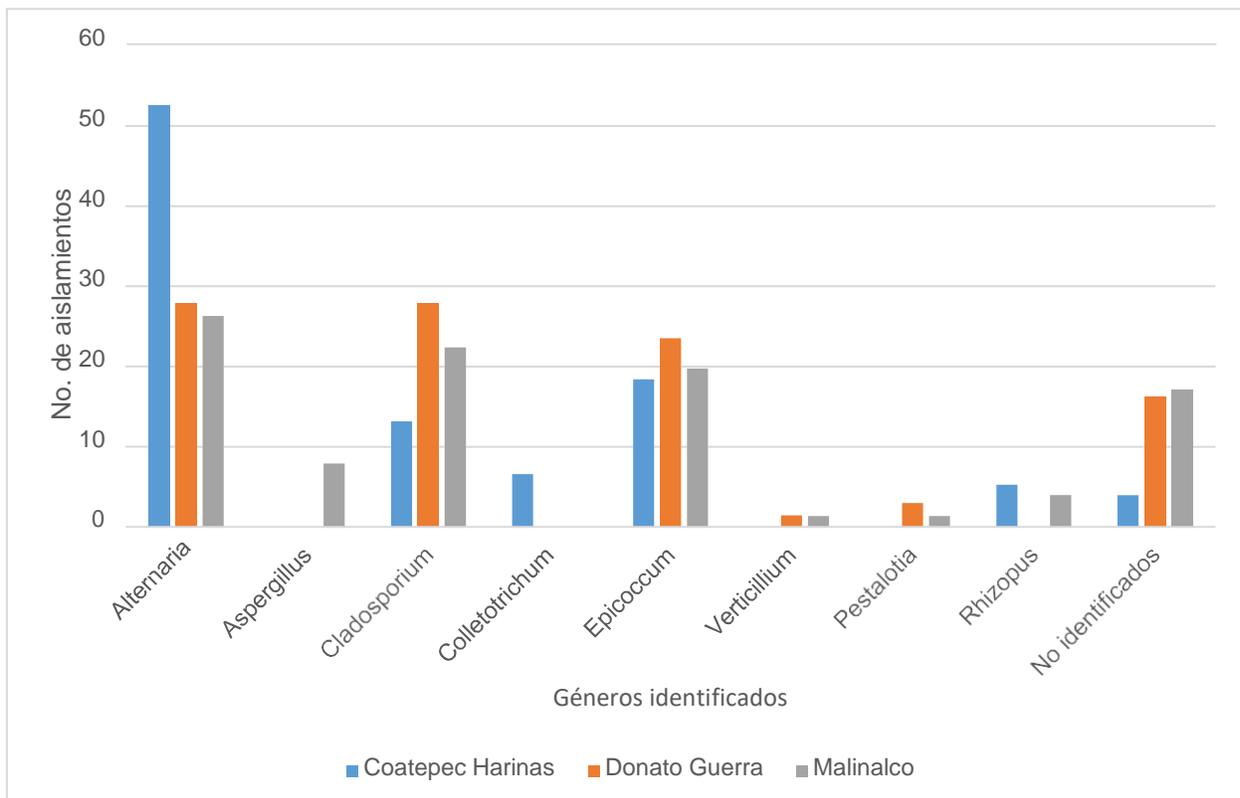


Figura 9. Frecuencia de aparición de los hongos encontrados en los aislamientos de los pedúnculos que presentaron lesiones de anillamiento de pedúnculo en los diferentes municipios del Estado de México.

La frecuencia de hongos que aparecieron por cada municipio de colecta se presenta en el Cuadro 8 en donde se indica el género encontrado, observando que *Alternaria sp.*, fue el hongo con mayor predominancia.

Cuadro 8. Porcentaje de aparición de patógenos encontrados en el proceso de aislamiento de las colectas realizadas por municipio colectado.

Hongo	Municipios de colecta		
	Coatepec Harinas	Donato Guerra	Malinalco
	%	%	%
<i>Alternaria</i> sp.	52.63	27.94	26.31
<i>Epicoccum</i> sp.	18.42	23.52	19.73
<i>Cladosporium</i> sp.	13.15	27.94	22.36
<i>Colletotrichum</i> sp.	6.57	0	0
<i>Rhizopus</i> sp.	5.26	0	3.94
<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	7.89
<i>Verticillium</i> sp.	0	1.47	1.31
<i>Pestalotia</i> sp.	0	2.94	1.31
No identificados	3.94	16.17	17.10

7.2. Identificación morfométrica de las especies evaluadas

Con base en las características culturales, morfológicas y micrométricas se identificaron tres deuteromicetes que corresponden a las especies de *Alternaria tenuissima* (Nees y T. Nees: Fr.), *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) y *Epicoccum nigrum* Link.

7.2.1. *Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.)

En medio de cultivo PCA la colonia creció 5 cm de diámetro entre los 5 y 7 días a 25 °C ± 2, bajo luz blanca y oscuridad en una alternancia de 16 h luz y 8 h de oscuridad. El crecimiento de la colonia fue de forma plana y los bordes completos, la coloración que presentó fue verde oliváceo y conforme maduró se tornó a color negruzco, presentó un par de anillos concéntricos. La esporulación en medio de cultivo PCA fue abundante (++) . En medio de cultivo V8 el micelio se observó algodonoso y con poca formación de conidios en su mayoría de manera individual resultando una esporulación escasa en este medio.

Las cadenas de conidios fueron de 4 a 13 conidios en medio PCA, observándose la presencia de conidióforos primarios de crecimiento erecto, los cuales presentaron en promedio 104.6 μm de largo por 5 μm de ancho.

Los conidios se observaron de forma muriforme con 4 - 7 transeptos y de 2 - 3 longiseptos encontrándose en un tamaño de 15 a 37.5 μm de largo x 7.5 a 17.5 μm de ancho, los conidios se visualizaron de color café claro a café oscuro con ornamentación punteada alrededor de estos, como se muestra en la Figura 10.

Con base en las características morfométricas encontradas en el género *Alternaria* sp., la especie corresponde a *Alternaria tenuissima* (Nees y T. Nees: Fr.) (Simmons, 2007).

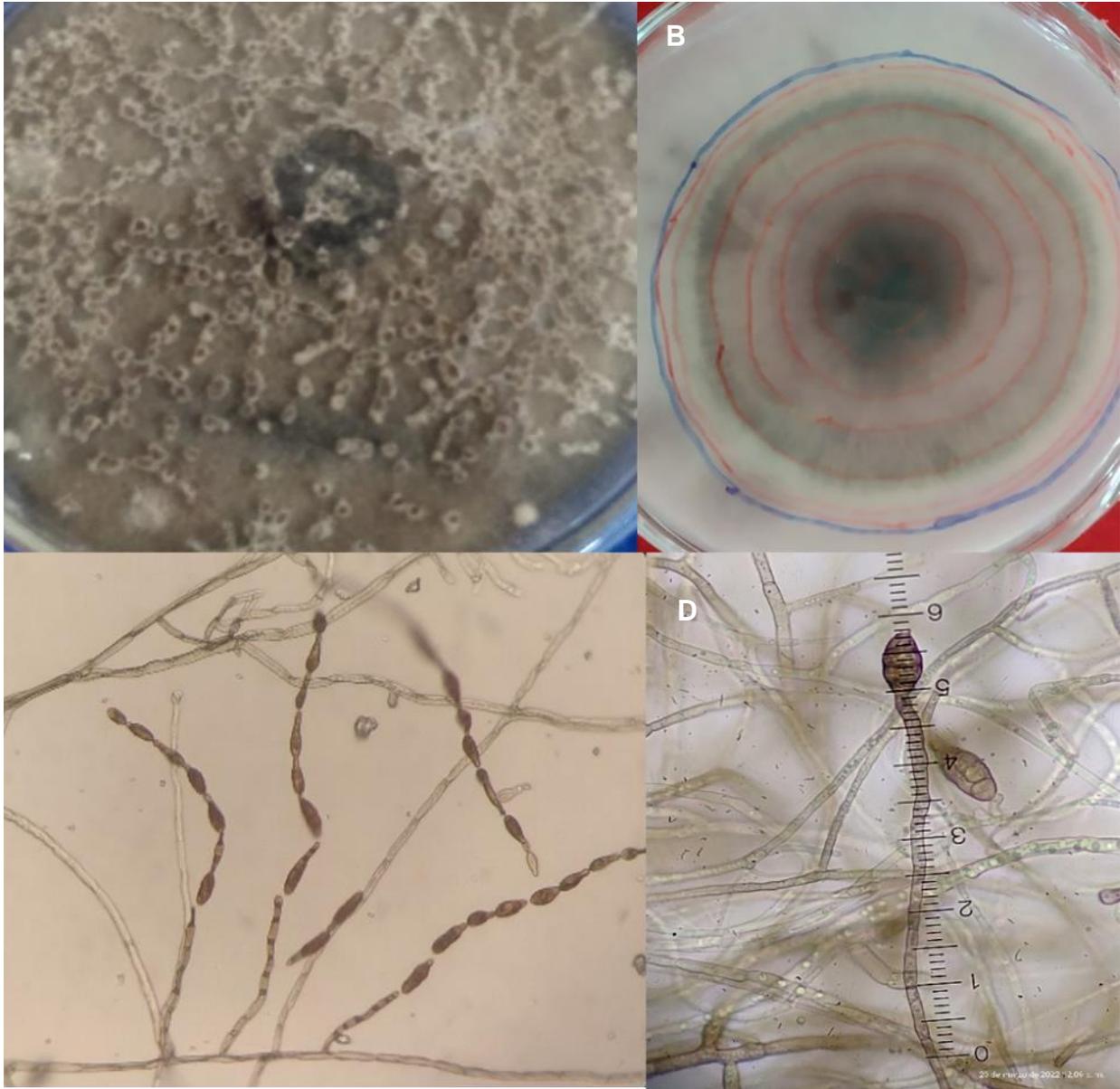


Figura 10. Características culturales y morfométricas de *Alternaria tenuissima*. A) Colonia de *A. tenuissima* de crecimiento plano cultivada en medio PCA. B) Crecimiento de la colonia de *A. tenuissima* observada por la parte inferior. C) Conidios en cadena de 4-13 originados de conidióforos primarios de crecimiento erecto. D) Medición de conidios muriformes con reglilla micrométrica.

7.2.2. *Cladosporium cladosporioides* (Fresen)

En medio de cultivo PDA la colonia creció entre 11.06 mm mínimo y máximo 23.83 mm de diámetro con crecimiento lento entre los 18 y 20 días a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, en condiciones de laboratorio, no fue necesario brindarle condiciones de luz para inducir la formación de conidios. El crecimiento de la colonia fue de forma circular con bordes plumosos de color blanco, presentó coloración verde oliváceo a oscuro por la parte frontal, mientras que por el reverso se notó de coloración negra, siendo de superficie plana aterciopelada, micelio adherido al medio de cultivo, afelpado o flocoso de septos oscuros, la esporulación en medio PDA fue abundante (++) .

Las colonias presentaron micelio septado de color marrón, presencia de conidios catenados en cadenas largas y ramificadas, conidios pequeños de forma subglobosa a ovoide, presencia de conidios intercalares de forma elipsoide a ovoide, ocasionalmente subcilíndricos sin septos, de color café oliváceo a marrón, en algunas ocasiones agrupados en ramoconidios, esporas de tamaño micrométrico entre los 2.5-7.5 μm de largo por 2.5-5 μm de ancho, conidióforos cortos y rectos con septos color oliva a marrón en la punta (Figura 11).

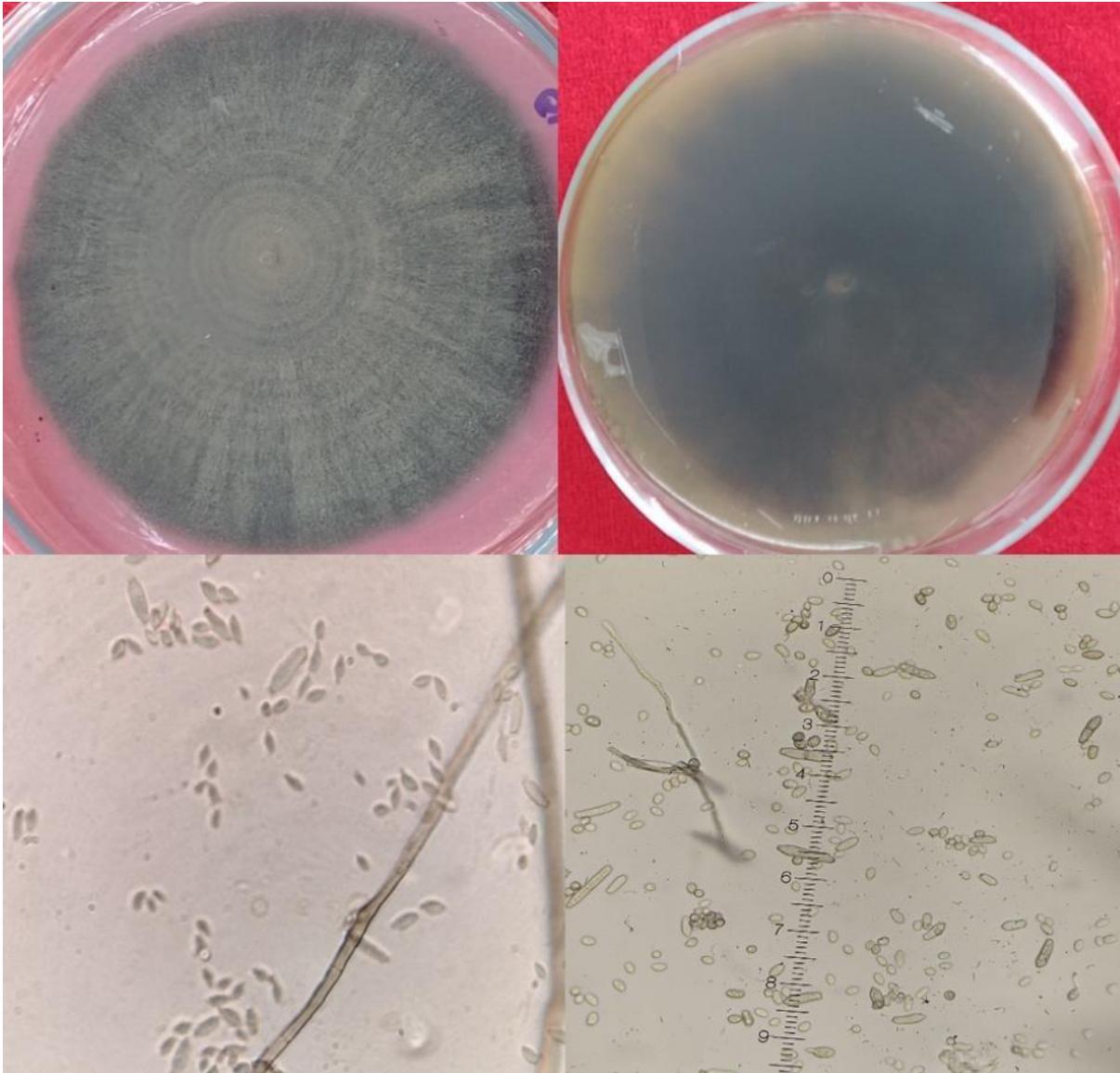


Figura 11. Características culturales y morfométricas de *Cladosporium cladosporioides*. A) Colonia de *C. cladosporioides* con micelio flocoso cultivada en medio PDA de la parte frontal. B) Crecimiento de la colonia de *C. cladosporioides* observada por la parte del reverso. C) Conidios solitarios desprendidos del conidióforo. D) medición de conidios unicelulares con reglilla micrométrica.

7.2.3. *Epicoccum nigrum* Link

En medio de cultivo PDA la colonia fue de crecimiento lento alcanzó 2.38 cm de diámetro entre los 12 y 15 días a temperatura de ± 22 °C según los datos registrados por un equipo data logger marca HOBO®, bajo luz blanca continua, condiciones necesarias para la formación de conidios y clamidosporas, dos características morfológicas necesarias para la determinación de la especie.

El crecimiento de las colonias fue de forma irregular, la coloración fue de color naranja inicial y conforme maduró se observó un crecimiento micelial de color blanco algodonoso, por el reverso se visualizó de color naranja a rojo oscuro cuando la colonia fue madura, el medio de cultivo PDA fue pigmentado conforme fue invadido por el micelio.

De manera microscópica se observaron clamidosporas de coloración marrón a café oscuro de forma globosa multicelulares de 12.5 a 22.5 μm de diámetro, lo cual coincide con la literatura que reporta conidios de 8 a 35 μm de diámetro, micelio aseptado hialino cuando joven y en su madurez alcanza coloración marrón, micelio aéreo escaso, pero de forma copetuda o en forma de mechones en el centro de la colonia de color blanco (Figura 12).

Con base en las características morfométricas y culturales las cepas del género *Epicoccum* sp., identificadas correspondieron a *Epicoccum nigrum* Link de acuerdo con lo descrito por Aveskamp *et al.* (2010).

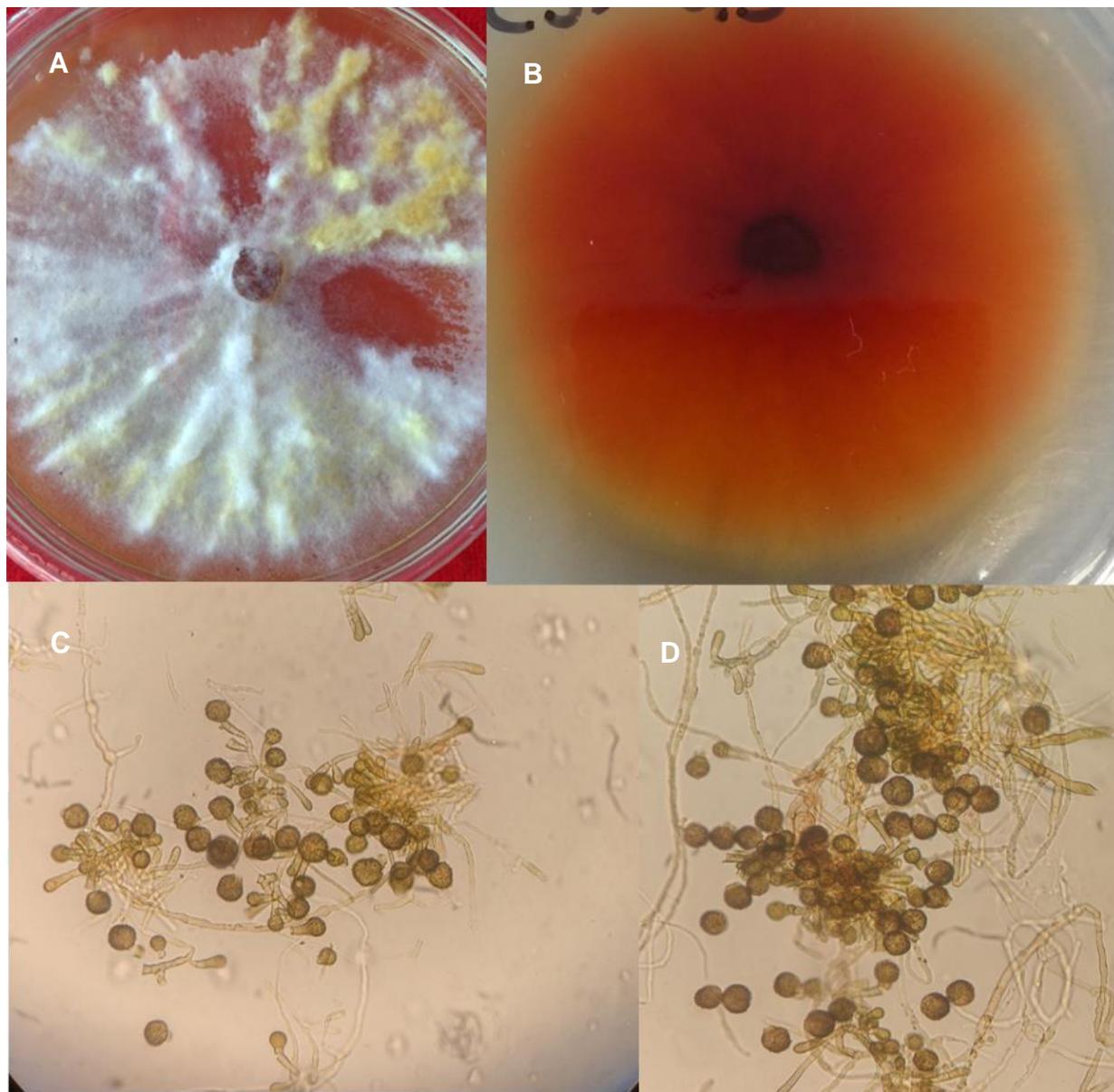


Figura 12. Características culturales y morfométricas de *Epicoccum nigrum*. A) Colonia de *Epicoccum nigrum* de crecimiento plano y desarrollo de micelio algodonoso crecida en medio PDA. B) Crecimiento de la colonia observada por la parte inferior presentando coloración rojiza. C) Formación de clamidosporas multicelulares. D) Micelio cenocítico y clamidosporas globosas de *E. nigrum*.

7.3. Análisis molecular

Los productos obtenidos por la PCR de las regiones ITS y el gen β -tubulina; secuenciadas y alineadas en el banco de genes NCBI GenBank se obtuvo lo siguiente. Con *Alternaria* sp., la secuenciación del producto de las regiones ITS fue de 566 pb de longitud correspondientes a las regiones ITS 4 y 5. Las secuencias se alinearon con la especie de *Alternaria tenuissima* de la accesión MT573466 con un 100% de identidad. Para la porción amplificada con el gen β -tubulina se obtuvo una secuencia de 261 pb de longitud y se alineó con secuencias de *Alternaria tenuissima* con un 100 % de identidad correspondiente a la accesión MN445975 (Cuadro 9).

Las secuencias de los ITS 4 y 5 de *Epicoccum* sp., que resultaron de la alineación de la parte amplificada de su ADN fue de 528 pb de longitud, estas secuencias fueron comparadas con la base de datos del Gen Bank y se alineo con las secuencias de la accesión MG602540 correspondiendo al 100% de identidad con *Epicoccum nigrum*, por su parte las secuencias que se analizaron mediante el gen β -tubulina brindaron una longitud de 302 pb y las secuencias coincidieron con la accesión MK051182 con el 98% de identidad a *Epicoccum* sp (Cuadro 9).

Las secuencias de *Cladosporium* sp., resultado de la alineación de la porción amplificada de su ADN fue de 528 pb para las secuencias resultantes de los ITS 4-5, estas secuencias resultaron alinearse con las de la accesión MT573472 en un 100% de identidad correspondiendo a *Cladosporium cladosporioides*, mientras que las secuencias del gen β -tubulina se compararon con las de la accesión MH780075 en un 98.22% de identidad con *C. cladosporioides* según los datos proporcionados por el Gen Bank (Cuadro 9).

Cuadro 9. Resultados de la identificación molecular a nivel de especie de los géneros *Alternaria* sp., *Epicoccum* sp., y *Cladosporium* sp., mediante la amplificación con ITS's y del gen β - tubulina comparados con accesiones del GenBank.

Género identificado	ITS	β- tubulina	% de identidad	Localidad	Accesión
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>A. Tenuissima</i>		100%	Polonia	MT573466
		<i>A. tenuissima</i>	100%	China	MN445975
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>E. nigrum</i>		100%	Uganda	MG602540
		<i>Epicoccum. sp.</i>	98%	China	MK051182
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		100%	Polonia	MT573472
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	98.22	Serbia	MH780075

7.4. Pruebas de patogenicidad en laboratorio

Las pruebas de patogenicidad corridas en laboratorio permitieron la replicación de los síntomas del anillamiento de pedúnculo en frutos de aguacate. Se observó, el ahorcamiento característico en el pedúnculo iniciando con una mancha café y tomando la apariencia corchosa en el pedúnculo conforme la lesión se hacía progresiva, los frutos mostraron manchas de coloración rojiza a púrpura. En la pulpa se presentaron manchas de color café a negro de manera punteada y en forma de anillos alrededor de la pulpa llegando a observarse su descomposición, en algunos frutos se visualizaron cavidades con abundante micelio de color blanco (Figura 13), estos síntomas coinciden con los observados en campo y reportado en la literatura.



Figura 13. Sintomatología desarrollada en frutos inoculados con *Epicoccum nigrum*. A) Fruto con daño en pedúnculo y coloración púrpura en epicarpio, B) Corte longitudinal en fruto mostrando lesiones de color café a oscuras en la pulpa, C) Crecimiento de micelio en la pulpa del fruto observado en microscopio estereoscópico.

7.4.1. Variables evaluadas *in vitro*

La incidencia estuvo determinada por la interacción de *Alternaria tenuissima* y *Cladosporium cladosporioides*, siendo mayor cuando *C. cladosporioides* actúa de manera independiente.

Las lesiones que se manifestaron en los tratamientos donde hubo respuesta al inoculo fueron la corchosis del anillamiento en el pedúnculo. El tratamiento con *C. cladosporioides* presentó un 82 % de incidencia seguido con un 76 % cuando se encuentra *Alternaria tenuissima* de manera independiente, mientras que la interacción de ambos fue apenas del 45 % (Cuadro 10). Sin embargo, a pesar de que fue el tratamiento que desarrollo en mayor porcentaje la característica corchosa de anillamiento en el pedúnculo, los demás tratamientos inoculados también mostraron esa característica pero en menor cantidad de frutos inoculados, el tratamiento testigo inoculado con agua destilada estéril no mostro dicha característica, ya que en los pedúnculos sólo se observó la cicatriz formada por la herida provocada.

La manifestación de síntomas del anillamiento en los pedúnculos-ocurrió entre 1.06 y 6.15 días después de la inoculación de los patógenos. La interacción entre *Alternaria tenuissima* y *Cladosporium cladosporioides* fue en la que se manifestaron en menor tiempo (1.06 días), en tanto que, cuando estuvieron juntos *Alternaria tenuissima*, *Cladosporium cladosporioides* y *Epicoccum nigrum* el tiempo a la manifestación de las lesiones fue de 5.01 días. Sin embargo, el tratamiento con *Alternaria tenuissima* en ausencia del resto de patógenos, requirió un día más (6.15 días) para manifestar los síntomas del anillamiento del pedúnculo (Cuadro 10).

Cuadro 10. Variables evaluadas en laboratorio que mostraron diferencia mínima significativa.

Incidencia			Días a manifestación de síntomas			
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	%	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Días
1	1	45 ^a	1	0	1	1.06 ^a
0	0	45 ^a	0	0	0	1.47 ^a
1	0	76 ^b	1	1	0	2.34 ^a
0	1	82 ^b	0	0	1	2.59 ^a
			0	1	1	3.53 ^b
			0	1	0	4.36 ^b
			1	1	1	5.01 ^b
			1	0	0	6.15 ^b

1=Presencia del patógeno 0=Ausencia de patógeno. Los datos de incidencia fueron transformados $ArcSen(\sqrt[2]{\% \text{ de incidencia}})$, mientras que días a manifestación de síntomas se transformaron sólo con $(\sqrt[2]{x})$. Literales distintas implican diferencia significativa en Prueba DCG ($p \leq 0.05$) (Di Rienzo *et al.*, 2020).

La separación de medias mediante la prueba DCG ($p \leq 0.05$) indica que el mayor porcentaje de frutos dañados en la pulpa del experimento *in vitro* fue registrado en los frutos de aguacate ‘Hass’ inoculado con *Epicoccum nigrum* 51.84 % en relación con un 29.16 % presente en los tratamientos en donde no se incluyó el inóculo de este patógeno, se encontraron manchas de color café, puntos negros alrededor de la semilla e incluso descomposición total de la pulpa (Cuadro 11).

Para la variable días a aparición de micelio, resulta significativa la interacción entre *Alternaria tenuissima* y *Cladosporium cladosporioides* donde se observó que a pesar de la interacción de estos patógenos *A. tenuissima* por si sola requiere mayor tiempo (3.76 días) para su establecimiento y desarrollo de micelio (Cuadro 11).

Cuadro 11. Variables de daño en pulpa y días a aparición de micelio evaluadas en laboratorio.

Daño en pulpa		Días a aparición de micelio		
<i>E. nigrum</i>	%	<i>A. tenuissima</i>	<i>C. cladosporioides</i>	Días
0	29.16 ^a	0	0	0.43 ^a
1	51.84 ^b	1	1	1.12 ^a
		0	1	2.25 ^b
		1	0	3.76 ^b

1=Presencia del patógeno 0=Ausencia de patógeno. Daño en pulpa y días a aparición de micelio se transformaron $(\sqrt[2]{x})$. Literales distintas implican diferencia significativa en Prueba DCG ($p \leq 0.05$) (Di Rienzo *et al.*, 2020).

La variable de severidad al ser trabajada mediante la fórmula de Townsed y Heuberger (1943) con relación a las diferentes clases de la escala de severidad propuesta indicaron que los síntomas fueron mayores en los frutos inoculados con *Cladosporium cladosporioides* (T7) seguido de los inoculados con *E. nigrum* (T5) destacando que el testigo (T8) fue el tratamiento que presentó el porcentaje de severidad más bajo en

comparación con el resto de los tratamientos, conservando los frutos, la apariencia sana y coloración verde (Cuadro 12). Los síntomas observados en frutos fueron manchas rojizas a purpuras, en algunos casos el pericarpio del fruto se visualizó de coloración negra tornando a algunos frutos con la apariencia de momificación, síntoma característico de la enfermedad.

Cuadro 12. Severidad en frutos de aguacate inoculados con *A. tenuissima*, *C. cladosporioides*, *E. nigrum* y sus combinaciones.

Severidad en frutos	
Tratamientos	%
T7 <i>C. cladosporioides</i>	42.67 a
T5 <i>E. nigrum</i>	38.67 a b
T6 <i>A. tenuissima</i>	24.0 a b c
T4 <i>E. nigrum</i> + <i>C. cladosporioides</i>	22.67 a b c
T3 <i>A. tenuissima</i> + <i>C. cladosporioides</i>	13.33 a b c d
T2 <i>A. tenuissima</i> + <i>E. nigrum</i>	9.33 b c d
T1 <i>A. tenuissima</i> + <i>C. cladosporioides</i> + <i>E. nigrum</i>	6.67 c d
T8 Testigo (agua destilada estéril)	1.33 d

Los datos se transformaron a porcentaje de severidad mediante la ecuación de Townsend y Heuberger (1943): $P = (\sum(n * v)) / ((N * i)) * 100$. Dónde: P= porcentaje de daño, ñ= número de frutos por cada clase en la escala, v=grado respectivo de la escala, N=número total de frutos evaluados, i=mayor grado de la escala. transformaron $(\sqrt[2]{x})$. Literales distintas implican diferencia significativa en Prueba Tukey ($p \leq 0.05$) (Di Rienzo *et al.*, 2020; Townsend y Heuberger, 1943).

Los síntomas que se manifestaron estuvieron en función de los patógenos inoculados sobre los pedúnculos y frutos, como se describe a continuación (Figura 14).

En el T1 (*Alternaria tenuissima*, *Epicoccum nigrum* y *Cladosporium cladosporioides*) los pedúnculos que presentaron síntomas estuvieron determinados por la presencia de

pequeñas manchas cafés llegando a la momificación del pedúnculo en algunos casos; en los frutos que enfermaron las lesiones observadas fueron la presencia de manchas rojizas, en los frutos donde se encontró daño en la pulpa se observaron manchas oscuras de crecimiento irregular (Figura 14-T1).

El T2 (*A. tenuissima* y *E. nigrum*) se caracterizó por pequeñas manchas cafés que causaron momificación en algunos de los pedúnculos que presentaron las manchas, en los frutos que enfermaron se observó la coloración rojiza en el pericarpio, los frutos que presentaron daño en la pulpa presentaron coloración necrótica y descomposición de la misma (Figura 14-T2).

Por su parte, los pedúnculos del T3 (*A. tenuissima* y *C. cladosporioides*) presentaron manchas de coloración café a rojizas en el pedúnculo y pedicelo, que ocasionaron la momificación de algunos pedúnculos, los frutos se observaron sanos, en la pulpa de los frutos que presentaron lesiones, se observaron pequeños puntos negros alrededor de la pulpa (Figura 14-T3).

El T4 (*E. nigrum* y *C. cladosporioides*) presentó pequeñas manchas cafés y causó la momificación en algunos pedúnculos, los frutos mostraron lesiones como pequeños puntos rojizos en el pericarpio, de acuerdo con la escala de severidad se clasificaron en la clase 1 y 2, el daño en pulpa de los frutos que presentaron este síntoma, se determinó por presencia de pequeños puntos de coloración café y necróticos (Figura 14-T4).

Mientras que el T5 (*E. nigrum*) mostró la aparición de manchas cafés a rojizas en los pedúnculos, los frutos que presentaron estos síntomas se catalogaron con base en la escala propuesta, clasificándolos desde la clase 1 a la 5 (Figura 7), por su parte, los frutos con daño en la pulpa presentaron manchas cafés y descomposición de la pulpa (Figura 14-T5).

En el T6 (*A. tenuissima*) las lesiones presentadas fueron manchas cafés en los pedúnculos y momificación de algunos, los frutos se observaron sanos, el daño en pulpa de los frutos que presentaron este síntoma se caracterizó por manchas cafés y descomposición (Figura 14-T6).

A su vez en el T7 (*C. cladosporioides*) algunos de los síntomas fueron: manchas café y momificación de los pedúnculos, los frutos que enfermaron fueron clasificados con la escala propuesta y se agruparon en la clase 1, la pulpa presento manchas café y se observó su maduración (Figura 14-T7).

En el testigo (T8 agua destilada estéril) la mayoría de los pedúnculos no presentaron lesiones, los frutos se observaron sanos al igual que la pulpa (Figura 14-T8).

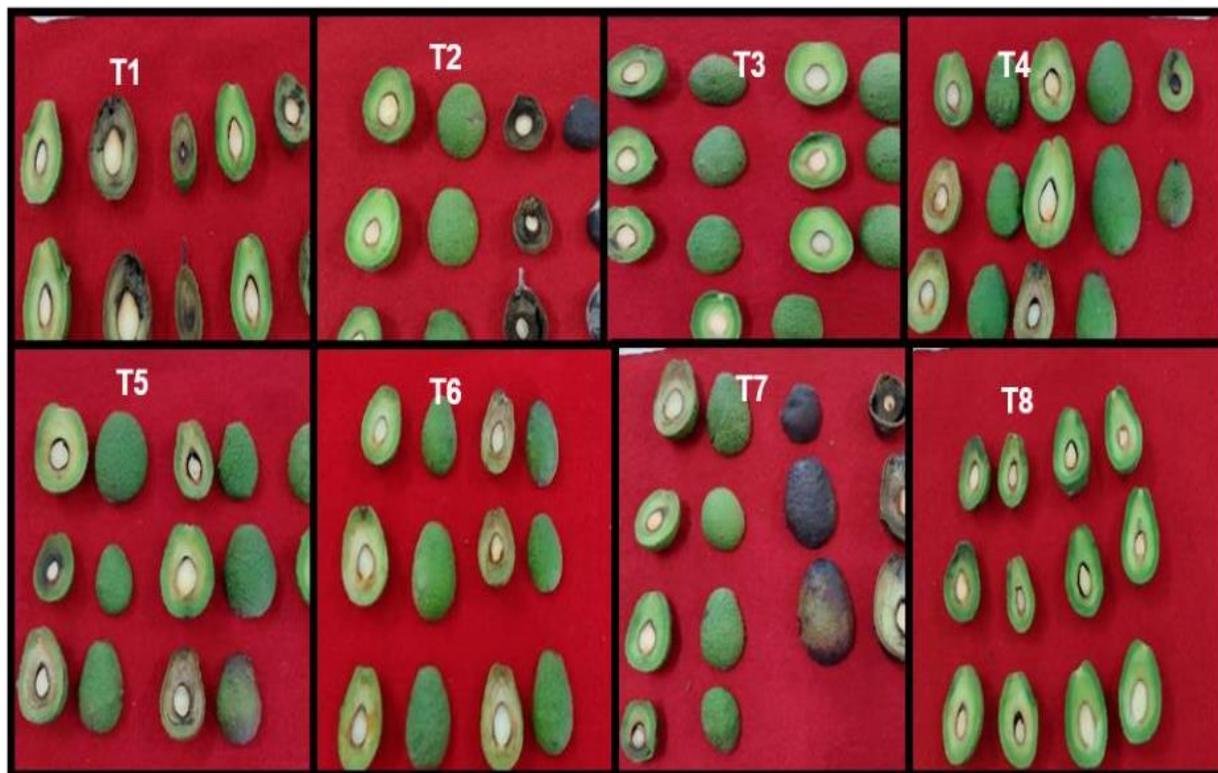


Figura 14. Síntomas observados en frutos inoculados con los diferentes hongos, en conjunto y de manera independiente: T1) *Alternaria* + *Epicoccum* + *Cladosporium*. T2) *Alternaria* + *Epicoccum*. T3) *Alternaria* + *Cladosporium*. T4) *Epicoccum* + *Cladosporium*. T5) *Epicoccum*; T6) *Alternaria*; T7) *Cladosporium*, T8) Testigo.

7.4.2. Pruebas de patogenicidad *ex vitro*

En el experimento realizado en campo las inoculaciones de los diferentes tratamientos asperjados sobre los frutos de aguacate 'Hass' dieron como resultado que el tratamiento correspondiente a *A. tenuissima* a diferencia de los demás, fue el que presentó menor

porcentaje de incidencia, en cuanto a las variables: incidencia, días a manifestación de síntomas y daño en pulpa, el número 1 representa la presencia del patógeno y 0 la presencia de cualquiera de los demás tratamientos (Cuadro 13).

En la variable días a manifestación de síntomas, haciendo uso de la prueba de DCG ($p \leq 0.05$), dio como resultado que los frutos inoculados con *A. tenuissima* mostraron síntomas a partir de 1.46 días siendo este tratamiento el que presentó primeramente el desarrollo de síntomas en comparación con los demás tratamientos, en donde el desarrollo de síntomas fue mayor a los 6.2 días, los síntomas observados fueron manchas cafés en el pedúnculo y pérdida de turgencia de los frutos

El daño en pulpa se evaluó mediante presencia (1) o ausencia (0), indicando que los tratamientos y el testigo mostraron daño, a excepción de los frutos inoculados con *A. tenuissima* en que se obtuvo el valor más bajo con relación en los demás tratamientos, con un valor de 0.49% de frutos dañados (Cuadro 13).

Cuadro 13. Variables que presentaron diferencia significativa únicamente con *Alternaria tenuissima* en las pruebas de patogenicidad establecidas en campo.

<i>Alternaria tenuissima</i>					
Incidencia		Manifestación de síntomas		Daño en pulpa	
	%		Días		%
1	13.07 ^a	1	1.46 ^a	1	.49 ^a
0	41.5 ^b	0	6.20 ^b	0	20.2 ^b

1= la presencia del patógeno, 0=Ausencia de patógeno. Los datos de incidencia fueron transformados $ArcSen(\sqrt[2]{\% \text{ de incidencia}})$, mientras que días a manifestación de síntomas y daño en pulpa, y su transformación $(\sqrt[2]{x})$. Literales distintas implican diferencia significativa en Prueba DCG ($p \leq 0.05$) (Di Rienzo *et al.*, 2020).

De igual forma en los datos de severidad registrados en campo, al ser sometidos a la prueba de separación de medias mediante Tukey ($p \geq 0.05$) y utilizando la escala de severidad propuesta para referenciar los frutos en comparación al daño establecido en la escala propuesta, los datos indicaron que no existió diferencia significativa de los

tratamientos con el testigo, razón por la que no fue posible observar diferencias entre tratamientos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Porcentaje de severidad de los diferentes tratamientos evaluados en campo.

Severidad	
Tratamientos	%
T7 (<i>C. cladosporioides</i>)	13.33 ^a
T4 (<i>E. nigrum</i> y <i>C. cladosporioides</i>)	9.33 ^a
T5 (<i>E. nigrum</i>)	9.33 ^a
T3 (<i>A. tenuissima</i> + <i>C. cladosporioides</i>)	8.0 ^a
T8 (Testigo agua destilada estéril)	5.33 ^a
T1 (<i>A. tenuissima</i> , <i>E. nigrum</i> y <i>C. cladosporioides</i>)	2.67 ^a
T2 (<i>A. tenuissima</i> + <i>E. nigrum</i>)	1.33 ^a
T6 (<i>A. tenuissima</i>)	0.00 ^a

Los datos se transformaron a porcentaje de severidad mediante la ecuación de Townsend y Heuberger (1943): $P = (\sum(n * v)) / ((N * i)) * 100$. Dónde: P= porcentaje de daño, ñ= número de frutos por cada clase en la escala, v=grado respectivo de la escala, N=número total de frutos evaluados, i=mayor grado de la escala, transformados mediante ($\sqrt[2]{x}$). Literales distintas implican diferencia significativa por prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) (Di Rienzo *et al.*, 2020; Townsend y Heuberger, 1943).

En los frutos inoculados con los diferentes tratamientos, se presentaron síntomas como pérdida de turgencia y manchas cafés en el pedúnculo, pero no se presentaron síntomas de coloración purpura en el fruto, razón por la que su apariencia se observó de coloración verde como se muestra en la (figura 15).

7.4.3. Manifestación de síntomas observados en campo

En el tratamiento uno (T1) formado por la combinación de *Alternaria*, *Epicoccum* y *Cladosporium*, de manera general se observó que los frutos inoculados presentaron flacidez, pero la pulpa se observó sana, no se manifestó la presencia de manchas cafés en el pedúnculo, ni coloración rojiza en el pericarpio del fruto (Figura 15-T1).

En los frutos inoculados con *A. tenuissima* más *E. nigrum* (T2) algunos de los síntomas observados fueron: flacidez en frutos y presencia de manchas cafés en el pedúnculo (Figura 15-T2). La inoculación de *A. tenuissima* más *C. cladosporioides* (T3) registró la presencia de manchas cafés en algunos de los pedúnculos y manchas rojizas en frutos (Figura 15-T3).

El tratamiento cuatro formado por la combinación de *E. nigrum* más *C. cladosporioides*, mostró en los frutos inoculados la presencia de manchas cafés a rojizas en la parte del pedúnculo de los frutos, mientras que los frutos mostraron lesiones en la pulpa en forma de pequeñas manchas cafés alrededor de la semilla (Figura 15-T4).

Los frutos inoculados con *E. nigrum* sólo mostraron coloraciones rojizas en el pedúnculo más no se observó manchas en el pericarpio del fruto ni algún otro síntoma característico del anillamiento (Figura 15-T5).

El (T6) inoculado con *Alternaria tenuissima* no presentó daños en pedúnculos, ni lesiones en frutos y en la pulpa, conservando la apariencia sana de los frutos (Figura 15 T6). Para el caso de los frutos inoculados con *C. cladosporioides* (T7), se mostró presencia de manchas de color café en los pedúnculos, y aparición de manchas rojizas en el pericarpio, mientras que el síntoma de daño en pulpa si se llegó a replicar en los frutos, mediante ligeras manchas punteadas de color negro (Figura 15-T7).

En el T8 a pesar de ser el testigo los pedúnculos presentaron ligeras manchas cafés, así mismo se observaron en la variable daño en pulpa, lesiones en forma de manchas cafés a oscuras (Figura 15 T8).

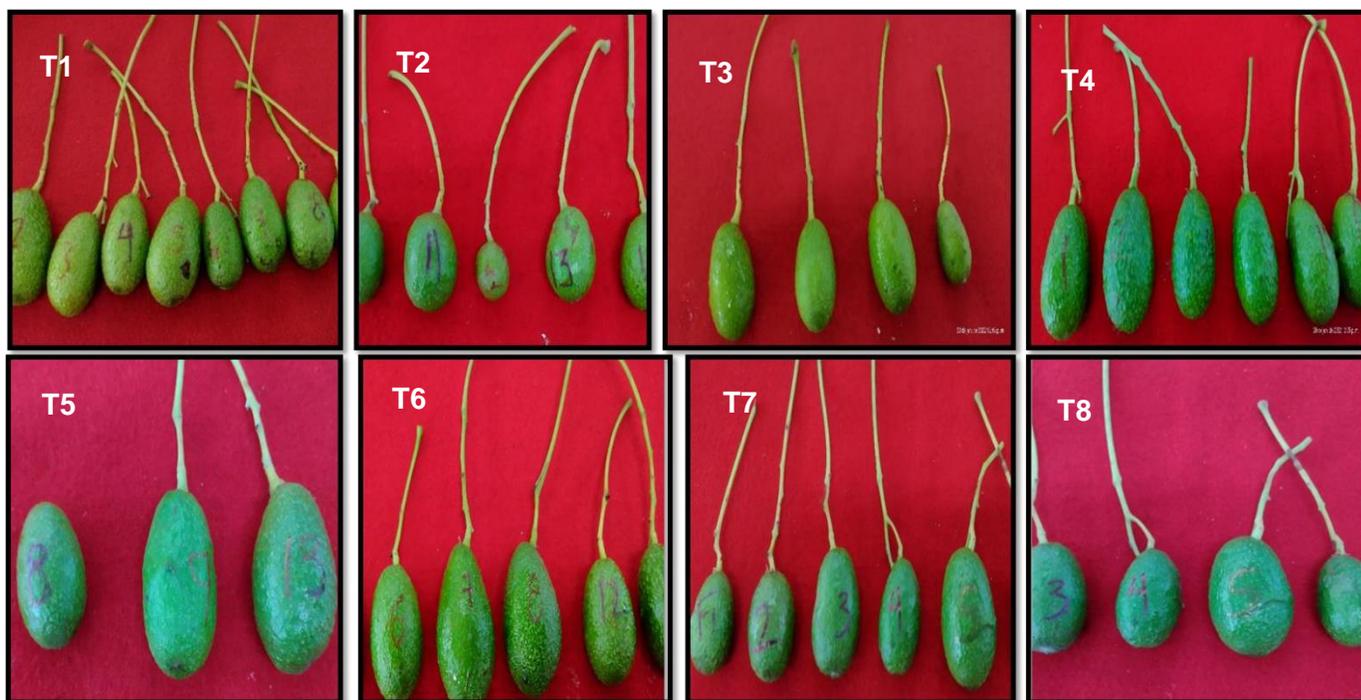


Figura 15. Sintomatología del anillamiento de pedúnculo del aguacate *ex vitro* por efecto de los tratamientos: T1) *Alternaria*, *Epicoccum* y *Cladosporium*, T2) *Alternaria* y *Epicoccum*, T3) *Alternaria* y *Cladosporium*, T4) *Epicoccum* y *Cladosporium*, T5) *Epicoccum*, T6) *Alternaria*, T7) *Cladosporium*: T8) Testigo.

Dado que en el experimento establecido *ex vitro* no fue posible la replicación total de los síntomas característicos del anillamiento en frutos de aguacate, algunos de los síntomas que se observaron fueron, presencia de manchas cafés en el pedúnculo, deshidratación y manchas cafés en la parte del pedicelo así como la pérdida de turgencia y deshidratación de los frutos (Figura 16).



Figura 16. Desarrollo de síntomas observados en los frutos inoculados *ex vitro*: A) mancha café en el pedúnculo del fruto, B) aparición de manchas cafés y deshidratación de pedúnculos en los frutos inoculados, C) pérdida de turgencia y deshidratación de los frutos

7.5. Re-aislamiento de hongos de los frutos inoculados *in vitro*

Para el re-aislamiento de los hongos inoculados en frutos, se tomó el 50 % de los frutos con síntomas por tratamiento y se recuperaron los tres hongos inoculados: *Alternaria tenuissima*, *Epicoccum nigrum* y *Cladosporium cladosporioides*. El hongo recuperado con mayor frecuencia fue *Alternaria tenuissima* con un 45.15 %, seguido de *Epicoccum nigrum* con un 33.8 % y finalmente *Cladosporium cladosporioides* con 21.05 % (Figura 17).

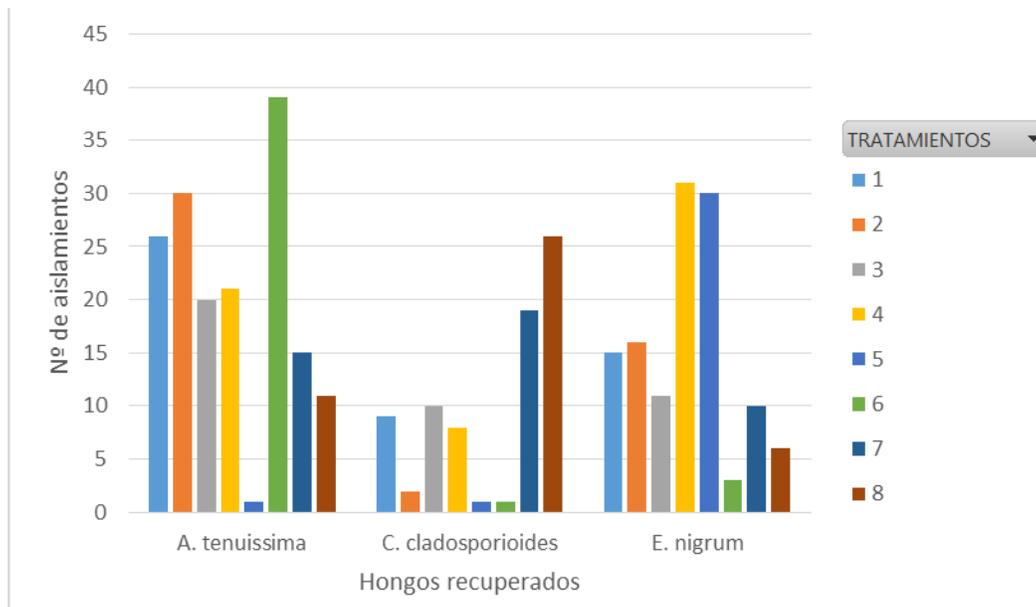


Figura 17. Recuperación de patógenos inoculados en laboratorio, se distinguen los ocho tratamientos: 1 (*A. tenuissima*, + *E. nigrum* + *C. cladosporioides*), 2 (*A. tenuissima* + *E. nigrum*); 3 (*A. tenuissima* + *C. cladosporioides*); 4 (*E. nigrum* + *C. cladosporioides*), 5 (*E. nigrum*), 6 (*A. tenuissima*), 7 (*C. cladosporioides*) y 8 (testigo).

7.6. Re-aislamiento de hongos inoculados *ex vitro*

En el caso de los hongos inoculados en frutos del experimento realizado en campo, al igual que en el re-aislamiento del experimento *in vitro* se recuperaron los tres géneros inoculados en los frutos señalando que el género recuperado con mayor frecuencia fue *Cladosporium cladosporioides* 59.28 %, seguido de *Alternaria tenuissima* 26.08 % y en menor frecuencia *Epicoccum nigrum* 14.62 % (Figura 18). Es preciso señalar, las limitaciones que se presentan para este tipo de trabajos en campo, al no tener un control holista de los factores que intervienen, de tal manera que tanto la réplica de los síntomas como la recuperación de las cepas no arrojaran datos que precisen y refuercen los datos obtenidos *in vitro* sobre la patología del anillamiento del pedúnculo

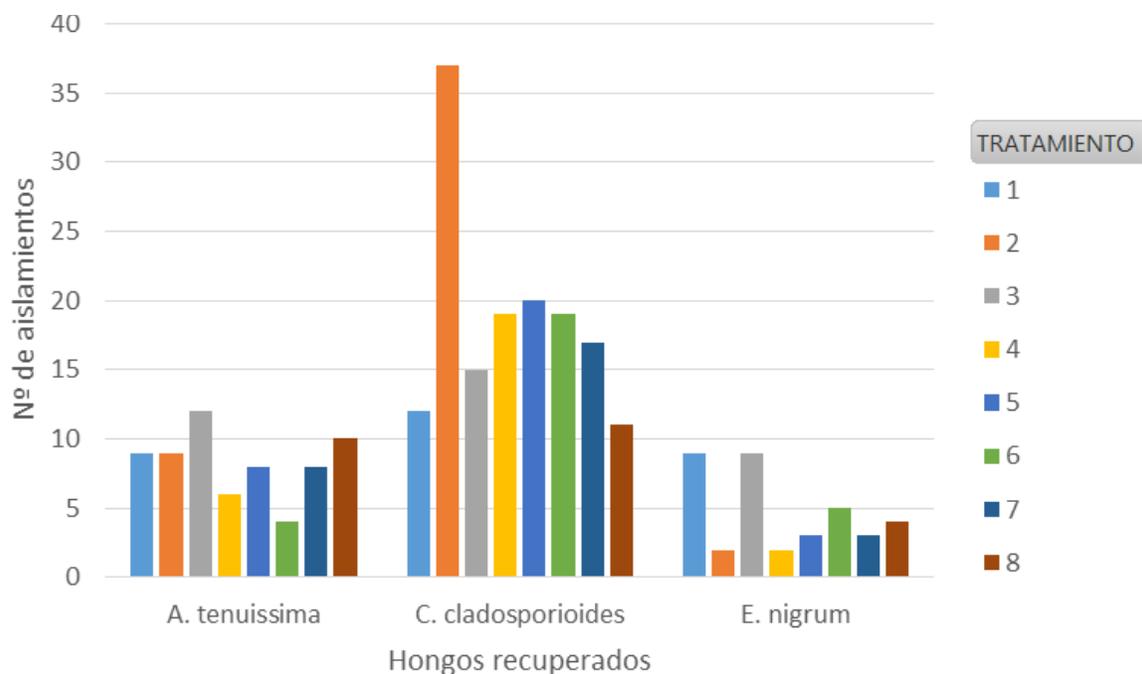


Figura 18. Recuperación de patógenos inoculados en campo, se distinguen los ocho tratamientos: 1 (*A. tenuissima*, + *E. nigrum* + *C. cladosporioides*), 2 (*A. tenuissima* + *E. nigrum*.), 3 (*A. tenuissima* + *C. cladosporioides*), 4 (*E. nigrum* + *C. cladosporioides*), 5 (*E. nigrum*), 6 (*A. tenuissima*), 7(*C. cladosporioides*) y 8 (testigo).

8. DISCUSIÓN

El cultivo del aguacate es uno de los principales frutales producidos en México principalmente establecidos en mayor superficie en los estados de Michoacán, Jalisco y el Estado de México, su rendimiento se ve reducido por la caída de frutos en estado juvenil, problemática conocida como ‘anillamiento de pedúnculo’, la cual afecta principalmente a la variedad ‘Hass’, este problema se le ha relacionado con diferentes factores como clima, suelo, nutrición, estrés, entre otros.

Sin embargo, con base a las lesiones, síntomas y signos la hipótesis de que se trata de una patología causada por hongos se fortaleció por Valencia y Téliz (2007) quienes al recopilar información sobre esta enfermedad reportaron esta problemática en frutos de aguacate caracterizada por la formación de un anillo café alrededor del pedúnculo y coloración purpura en el pericarpio del fruto ocasionando la caída de los frutos, al realizar cortes longitudinales, se observó la presencia de necrosis en la pulpa.

Los autores relacionaron esta patología con los hongos: *Diplodia* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium* sp., *Dothiorella* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotia* sp., *Hyalodendron* sp., *Sthempphyllum* sp., *Penicillium* sp. y *Glomerella* sp. Sin embargo, aunque no coincidieron todos los hongos aislados en este trabajo, hay uno en común *Alternaria tenuissima*, que logró replicar los síntomas de manera individual y en combinación con *Epicoccum nigrum* y *Cladosporium cladosporioides* mediante las pruebas de patogenicidad en laboratorio. Este mismo hongo fue reportado por Salgado (1993), quien aisló hongos de tejido con lesiones de anillamiento del pedúnculo y reportó la presencia de *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. y *Verticillium* sp, más en su trabajo, no realizó pruebas de patogenicidad que pudieran confirmar la asociación de los patógenos encontrados con la enfermedad.

Los hongos aislados fueron identificados como: *Alternaria tenuissima*, *Cladosporium cladosporioides* y *Epicoccum nigrum* y ya han sido reportados como los causantes de la necrosis de flores, pudrición y caída de frutos juveniles en huertos comerciales de papaya (*Carica papaya* L.) Morton (1987), quien reportó en el Estado de Veracruz que estos síntomas eran causados por *Chalara* sp, *Cercospora* sp., *Mycosphaerella* sp., *Phoma*

sp., recordando que este último es sinanamorfo de *Epicoccum* sp., *Alternaria alternata*, *Stemphyllum* sp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Guignardia* sp., *Monilia* sp., y *Rhizopus stolonifer*, pero su patogenicidad no fue confirmada. Por otra parte, en el Estado de Guerrero se trabajó con aislamientos de patógenos que ocasionan la pudrición y caída de frutos jóvenes en el cultivo de papaya y encontraron que fueron ocasionados por *Fusarium chlamydosporum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Alternaria alternata* (Vásquez *et al.*, 2012).

Morfológicamente las cepas del género *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) correspondieron de acuerdo a lo descrito por Bensch *et al.*, (2012) quien lo describió como una especie formadora de conidios pequeños subglobosos a ovoides, el tamaño encontrado se encuentra dentro del parámetro establecido (3-7x1.5-3 µm). Por su parte el crecimiento del género *Epicoccum* en medio PDA y las condiciones de temperatura y luz que se le dieron en el estudio, permitieron la formación de las estructuras determinantes para la especie, se ha reportado que el crecimiento de *Epicoccum* sp., en medio PDA genera colonias con diámetros que van de los 18 a los 73 mm, buen crecimiento micelial, en comparación con otros medios como MEA, OA y Czapeck-Dox, así mismo, el periodo de incubación para la formación de estructuras se da entre los siete y 14 días (Santos *et al.*, 2018), semejante a lo encontrado.

Los síntomas típicos de las lesiones por el anillamiento de pedúnculo, se replicaron en laboratorio donde el mayor porcentaje de incidencia se logró por la inoculación de *A. tenuissima* más *C. cladosporioides*, mientras que el desarrollo de síntomas en fruto como la coloración y la momificación, se determinó principalmente por *C. cladosporioides* y *E. nigrum*, estos tres patógenos mostraron síntomas, tanto de manera individual como en convivencia entre ellos, los síntomas registrados fueron epicarpio del fruto de coloración rojiza a púrpura, presencia de puntos negros a manchas cafés, así como cavidades recubiertas por micelio blanco en la pulpa y en algunos casos se observó momificación total del fruto, los cuales coinciden con los mencionados por Valencia y Téliz (2007), quienes en su investigación encontraron que uno de los agentes causales de producir los síntomas de la enfermedad está relacionado con el género *Alternaria* sp., coincidiendo de igual manera con lo reportado por Salgado (1993) quien también reportó a *Alternaria*

sp., como uno de los causantes de la enfermedad. Así mismo *Alternaria* sp., a nivel de género ha sido reportado como agente causal de la pudrición del pedúnculo en aguacate 'Hass', en este estudio se identificó la especie como *Alternaria tenuissima*.

Cladosporium cladosporioides se reporta en diversos cultivos causando daños como necrosis en flores y caída de los frutos en estado juvenil en el cultivo de papayo (Vásquez-López *et al.*, (2012) coincidiendo así con la caída de frutos de aguacate en estado juvenil atribuido al anillamiento de pedúnculo, por su parte Pérez y Sánchez (2019) reportaron al género *Cladosporium* como un hongo el cual puede tener especies tanto saprofitas como oportunistas, declarando que las especies oportunistas son capaces de causar enfermedades al ocurrir una disminución en los mecanismos de defensa de su hospedero, especies de *Cladosporium* pueden ser endófitas y al ocurrir desordenes nutricionales o estrés hidrico en las plantas pasan a ser patógenos (Zhang *et al.*, 2010), razón que podría coincidir con la creencia de que esta enfermedad puede estar dada por hongos, bacterias, deficiencias nutrimentales, estrés hidrico, entre otros factores abióticos, sin embargo, esta relación entre los síntomas de la enfermedad y los desordenes nutricionales o estrés hídrico no se puede abordar en la presente investigación debido a que no se llevo un seguimiento o interacción entre síntomas y deficiencias nutrimentales e hídricas.

Además, Yew *et al.* (2016), mencionaron que *Cladosporium* libera enzimas importantes en el desarrollo de la enfermedad tales como celulosas, pectinasas, peptidasas, hemicelulasas, glicosidasas, hidrolasas, glicosiltransferasas, carbohidrato estererasas, polisacarido liasas y xilanasas las cuales participan en la degradación de la pared celular de la planta, específicamente del pedúnculo, probablemente dando la apariencia corchosa, siendo esto una razón por la que *Cladosporium* a través de heridas, lenticelas, entre otros mecanismos de entrada con su hospedero, puede provocar los síntomas, ocasionando la enfermedad.

Por su parte *Epicoccum nigrum* (synanamorfo de *Phoma epicoccina*), es un hongo que ha sido utilizado en el control biológico para el manejo de enfermedades causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*), mientras que en *Vigna unguiculata*, mostró una reducción en la decoloración de la raíz causada por el hongo

Pythium irregulare, e incluso *E. nigrum* ha sido utilizado para la disminución de *Phytophthora infestans*. Sin embargo, en esta investigación se demostró que es un hongo que puede participar sólo y en presencia con los otros hongos, desarrolla la enfermedad causando manchas purpuras o rojizas en el pericarpio del fruto, e incluso llega a momificar frutos.

En campo no fue posible reproducir los síntomas mediante las inoculaciones realizadas, sólo se observó deshidratación en frutos, lo cual coincide con lo reportado por Valencia y Téliz-Ortíz (2007), donde indican que uno de los síntomas del anillamiento en campo puede llegar a ser la pérdida de turgencia de los frutos afectados por el anillamiento, aunque estadísticamente no fue significativo, debido a la falta de control total de todos los factores que intervienen en el proceso.

García (2023), mencionó que también los frutos jóvenes provenientes de la floración de invierno puede llegar a presentar caída prematura de hasta 80 %, razón por la que el anillamiento de pedúnculo no está limitado a una estación del año, o a una floración específica (Comunicación personal, García – Velasco R. 2023). Así mismo, recordar que el aguacate produce una gran cantidad de flores, 1000 veces más que el número de frutos maduros que puede llevar, y este hábito natural se relaciona con la caída constante durante su desarrollo, debido a causas fisiológicas por competencia nutrimental entre frutos y el crecimiento vegetativo (Gazit y Degani, 2003).

Ramírez y Morales (2019) al trabajar con anillamiento de pedúnculo, no pudieron aislar microorganismos a partir de frutos enfermos por lo que no fue posible la replicación de los síntomas. Por lo que la presente investigación resulta ser de las primeras en lograr la replicación de los síntomas en laboratorio a partir de microorganismos aislados de pedúnculos con lesiones causadas por esta enfermedad.

9. CONCLUSIONES

De los frutos colectados de aguacate que presentaron lesiones por anillamiento de pedúnculo, se logró identificar mediante caracterización morfológica y molecular a los patógenos identificados como *A. tenuissima*, *C. cladosporioides* y *E. nigrum*.

En las pruebas de patogenicidad realizadas en laboratorio, se logró la replicación de los síntomas característicos del anillamiento de pedúnculo, observando apariencia corchosa en el pedúnculo, así como manchas rojizas a purpuras en el pericarpio del fruto y descomposición de la pulpa en los diferentes frutos inoculados con los distintos tratamientos.

Cladosporium cladosporioides resultó de acuerdo con la comparación de medias, el patógeno que determina la incidencia de la enfermedad, mientras que *Epicoccum nigrum* y *C. cladosporioides* de manera independiente se consideraron como los patógenos causantes de la aparición de manchas en el pericarpio del fruto así como la descomposición de la pulpa.

No fue posible la replicación total de los síntomas, mediante las pruebas de patogenicidad realizadas en campo, ya que no se lograron apreciar los síntomas típicos del anillamiento del pedúnculo en los frutos inoculados con los diferentes tratamientos, ya que en campo es difícil el control de las condiciones.

Es importante señalar que a pesar de obtener buenos resultados en la replicación de síntomas en el experimento *in vitro* mediante los patógenos inoculados, no se descarta la posibilidad de otros factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad.

La presente investigación es la primera que se realiza con éxito en la replicación de los síntomas característicos del anillamiento, por lo que dicha investigación puede servir como base para futuras investigaciones sobre el desarrollo de esta enfermedad.

10. LISTA DE REFERENCIAS

- Agrios, G. N. (2013). Enfermedades de las plantas causadas por hongos. En G. N. Agrios, *Fitopatología* (2a ed., p. 285). México: Limusa.
- Anculle, A., y Álvarez, R. (2006). Senasa. Revisado 2022, de <http://www.bioline.org.br/pdf>
- Andersen, G. L., Frisch, A. S., Kellogg, C. A., Levetin, E., Lighthart, B., y Paterno, D. (2009). Acromicrobiology air quality. In *Enciclopedia of microbiology*. Retrieved 2022.
- Aveskamp, M. M., de Gruyer, J., Verkley, G. J., Woudenberg, J. H., Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise Phoma and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65(1), 60. doi:<https://doi.org/10.3114/sim.2010.6501>
- Barrientos Priego, A. F., y López, L. L. (2014). Historia y Genética del aguacate. *Researchgate*, 100-102. Revisado 2022, de <https://www.researchgate.net/publicación/237503161>
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z., y Crous, P. W. (2012). *The genus Cladosporium* (Vol. 72). Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Retrieved 2022, from www.studiesinmycology.org
- Boerema, G. H., Guyter, J., Noordelos, M. E., y Hamers, M. (2004). Phoma identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. *CABI Publishing*. Retrieved 2022.
- Bridge, P. D., y Arora, D. K. (1998). Interpretation of PCR Methods for Speciesm Definition. In P. D. Bridge, D. K. Arora, C. A. Reddy, y R. P. Elander, *Applications of PCR in Micology* (pp. 65-66). New York, EUA: CAB International.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria [CEDERSSA] . (2017). *Caso de exportación: El aguacate*. Ciudad de México: Palacio Legislativo de San Lázaro.
- Cervantes Cardenas, E. A., Lara Chávez, M. B., y Gutierrez Contreras, M. (2016). Respuesta fisiológica de Persea americana Mil var. hass a bacterias endofitas aisladas de frutos con síntomas de abscisión. Morelia, Michoacán, México. Revisado Febrero 2021, de http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/2064/FAPJ-M-2016-0431.pdf?sequence=1
- Chen, Q., Hou, L., Duan, W., Crous, J. W., P, W., y Cai, L. (2017). Dydimellacea revised. *Studyes in Micologi*, 87, 105-159.

- Crous, P. W., Verkley, G. J.M., Groenewald, J. Z and Samson, R. A. (2009). *Fungal biodiversity*. CBS. Laboratory Manual Series 1. Centraalbureau voor schimmelcultures. Utrecht, Netherlands. 270 p.
- de Gruyter, J., M. Aveskamp, M., H.C Woudenberg, J., J. M. Verkley, G., Groenewald, J. Z., y Crous, P. W. (2009, Abril). Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Micological Research*, 113(4), 508-519. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.002>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2020). InfoStat. (Universidad Nacional de Córdoba). Cordoba.
- Domínguez Serrano, D. (2012). *Patogenicidad del género Alternaria spp.. en variedades de Crisantemo (Dendranthema grandiflora Tzvelev)*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo.
- Edel, V. (1998). Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. In P. D. Bridge, D. K. Arora, C. A. Reddy, y R. P. Elander, *Applications of PCR in Micology* (p. 10). New York, EUA: CAB International.
- FAOSTAT. (2022). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Retrieved from FAOSTAT: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>
- Finazzo, S. F., Davenport, T. L., y Schafer, B. (1994). Partitioning of photoassimilates in avocado (*Persea americana* Mill). In S. F. Finazzo, T. L. Davenport, y B. Schaffer, *Tree physiology* (pp. 153-154). Oxford Academic.
- Glass, N. L., y Donaldson, G. C. (1995). Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol*, 61: 1323-1330. Retrieved 2022.
- Gazit, S. and C. Degani. 2003. Reproductive biology In. A. W. Whiley, B. Schaffer and B. N. Wolstenholme. The avocado, botany, production and uses. CABI Publishing. U.K. 101-134 pp. https://books.google.com.mx/books?id=m708ngEACAAJ&hl=es&source=gbs_book_other_versions
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT*. Nucleic Acids Symposium.
- Kang, Y., Zhang, J. X., Wan, Q., Xu, T. T., Li, C. X., y Cao, H. Q. (2019). First report of leave brown spot caused by *Epicoccum sorghinum* in *Dagitaria sanguinalis* in China. *Plant disease*, 103(7), 103. doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0332-PDN>
- Lin, S., Taylor, N. J., y Hand, F. P. (2018). Identification and characterization of fungal pathogens causing fruit rot of deciduous Holly. *Plant Disease*, 102(12), 2430-2445. doi:<https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0372-RE>

- Lin, Z. Y., Wei, J. J., Zhang, M. Q., Xu, S. Q., Guo, Q., Wang, X., . . . Powell, C. A. (2015, Marzo). Identification and characterization of a new fungal pathogen causing twisted leaf disease of sugarcane in China. *Plant Disease*, 99(3), 325-332. doi:<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0661-RE>
- López Cornejo, C. I. (2021). *Aislamiento e identificación morfológica y molecular del agente causal de la roña del aguacate (Persea americana Mill.) en Michoacán y Jalisco*. Tesis de Maestría, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, Ciencias Biológicas, Michoacan. Revisado 2022.
- Morton, J. F. (1987). *Fruits of Warm Climates*. Miami, Florida, EUA.
- N. S. S., S., R. L. R. , M., S. J., M., L. C., M., y S. M. A., O. (2001). *Hongos fitopatógenos asociados a frutos comercializados en Recife, Pernambuco (Brasil)*. Boletín micológico, Universidad Federal de Alagoas, Botánica, Pernambuco Brasil.
- Pérez Ramírez, I., y Sánchez Espinosa, K. C. (2019). Aspectos fisiológicos del género *Cladosporium* desde la perspectiva de sus atributos patogénicos, fitopatogénicos y biodeteriorantes. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 7(1), 1-10. doi:2307-695X
- Pineda Fonseca, M. D., Acosta Durán, C. M., Andrade Rodríguez, M., y Guillén Sánchez, D. (2006). *Control del anillado del pedúnculo del aguacate (Persea americana L.) en el oriente del Estado de Morelos*. Investigación Agropecuaria, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuernavaca, Morelos. Revisado 2021.
- Pinheiro de Menezas, C., Alves de Lima Pérez, A. L., y de Oliveira Lima, E. (2017, 02 15). *Cladosporium spp: Morfología, infecciones y especies patogénicas*. *Acta Brasiliensis*, 23-27. doi:<http://dx.doi.org/10.22571/Actabra1120176>.
- Qader, M. M., Hamed, A. A., Soldatous, S., Abdelraof, M., Elawady, M. E., Hassane, A. S., . . . Rateb, M. E. (2021). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of the Fungal Metabolites Isolated from the Marine Endophytes *Epicoccum nigrum* M13 and *Alternaria alternata* 13A. *Marine Drugs*, 19(232), 1-13. doi:<https://doi.org/10.3390/md19040232>
- Ramírez Gil, J. G., y Morales, J. G. (2019). Polyphasic identification of preharvest pathologies and disorders in avocado cv. Hass. *Agronomía Colombiana*, 37(3), 213-227. doi:10.15446/agron.colomb.v37n3.78528
- Reyes-Alemán, J. C., Mejía-Carranza, J., Monteagudo-Rodríguez, O. R., Valdez-Pérez, M. E., González-Díaz, J. G., y Espíndola-Barquera, M. C. (2021). Fenología del aguacate 'Hass' en el Estado de México, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 27(2), 113-134. doi:10.5154/r.rchsh.2020.09.020

- Rocha Arroyo, J. L., Salazar García, S., y Bárcenas Ortega, A. E. (2010). Determinación irreversible a la floración del aguacate 'Hass' en Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(4), 469-478. Revisada 2021.
- Rodrigues, T. T., Maffia, L. A., Dhingra, O. D., y Mizubuti, E. S. (2010). *In vitro* production of conidia of *Alternaria solani*. *Tropical Plant Pathology*, 35(4), 203-2012. Retrieved 2022, from www.sbfito.com.br
- Rodríguez, P. A., Rodríguez, E. J., Romero, B., y Collantes, R. D. (2006). Relación de la caída de naranja (*Citrus sinensis* (L.)) con dos especies de *Leptoglossus guerini menville* (Hemiptera: Coreidae) en la región de Azuero, Panamá. *Scientia*, 21(1), 77-87. Revisado 2022, de <https://201.226.239.124/index.php/scientia/article/view/482>
- Rotem, J. (1994). *The Genus Alternaria*. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society. Retrieved 2022.
- Salazar - García, S., Lord, E. M., y Lovatt, C. J. (1999). Inflorescence Development of the 'Hass' Avocado: Commitment to Flowering. *Journal American Society Horticulture*, 124(5), 478-482.
- Salazar García, S., González Durán, I. J., Cossio Vargas, L. E., Medina Torres, R., y Lovatt, C. J. (2005). Effect of Foliar applied Plant Bioregulators on "June Fruit Drop", Yield and Fruit Size of "Hass" Avocado. *Proceedings of the Tenth International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production*, (pp. 197-202). Saltillo, Coahuila. doi:10.17660/ActaHortic.2006.727.21
- Salgado Siclán, M. L. (1993). *Problemas Fitosanitarios de Aguacate en Coatepec de Harinas*. (CICTAMEX, Ed.) Coatepec Harinas, Estado de México, México: CICTAMEX. Revisado, 2021
- Santos Coletto, T., Nascimento, T., Cabral, A., y Oliveira, H. (2018). Caracterização de endófitos da videira pertencentes ao complexo *Epicoccum nigrum* e sua interação com fungos do lenho da videira. *Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal*, 67-81. doi:<https://doi.org/10.19084/RCA.17069>
- SIAP. (2022, 04 21). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Revisado 2022, from https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/
- SIAP-SAGARPA. (2018). *Servicio de información agroalimentaria y pesquera- Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. Revisado 2020, de http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- SIAP-SAGARPA. (2021). Revisado de https://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria An Identification Manual* (Vol. 6). Netherlands: CBS Fungal Biodiversity Centre. Retrieved 2022.

- Soto A, S., Rebufel A, P., y Barcos M, J. (2021). Identificación y caracterización de enfermedades de postcosecha de paltas var. Hass. (INIA, Ed.) *Tierra adentro*, 58-61. Revisado de <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67190/NR42380.pdf?sequence=27&isAllowed=y>
- Taguiam, J. D., Evallo, E., y Balendres, M. A. (2021). *Epicoccum* species: ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents. *Journal Plant Pathol*, 713-725. Retrieved 2022, from <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02207-w>
- Teliz. (2000). *Guía técnica del cultivo del aguacate*. Estado de México: Fundación Salvador Sánchez Colín, CIXTAMEX S.C.
- Trinidad Ángel, E., Ascencio Valle, F. d., Ulloa, J. A., Ramírez Ramírez, J. C., Ragazzo Sánchez, J. A., Calderón Santoyo, M., y Bautista Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (19), 3953-3964.
- Valencia-Aceves, M., y Téliz - Ortiz, D. (2007). Enfermedades del aguacate. In D. Téliz Ortiz, & A. Mora Aguilera, *El aguacate y su manejo integrado* (2a ed., p. 178). México, D.F., México: Mundi Prensa. Retrieved 07 29, 2022
- Vásquez-López, A., Hernández-Castro, E., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., y Sánchez-García, F. (2012). Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles de Papayo (*Carica papaya* L.) En Guerrero, México. *Agrociencia*, 757-767. Revisado 2022.
- Volcy, C. (2008). Genési y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115. Recuperado 2023, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000100013
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White, *PCR protocols a guide to methods and applications* (pp. 315-322). New York, New York: Academic Press.
- Wolstenholme, B. N., Moore Gordon, C. S., y Cowan, A. K. (1998). *South African Avocado Growers Association Yearbook*. Africa, Pietermaritzburg, South African: Association Yearbook.
- Yew, S. M., Chan, C. L., Ngeow, Y. F., Toh, Y. F., Na, S. L., Lee, K. W., . . . Kuan, C. S. (2016). Información sobre la daptación y alergenicidad de diferentes nichos ambientales del genoma de *Cladosporium sphaerospermum*, un Dothideomycetes común que provoca alergias humanas. *Reporte científico*. doi:10.1038/srep27008

- Yu-Ping, L., Chao-Jung, W., Hui-Wen, T., y Hui-Fang, N. (2021). Avocado Branch Cancker Diseases Caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* in Taiwan. *Journal Taiwan Agriculture Research*, 81-97. doi:10.6156/JTAR.202106_70(2).0001
- Zhang, Z. B., Zeng, Q. G., Yan, R. M., Wang, Y., Zheng, R. Z., y Zhu, D. (2010). El hongo endófito *Cladosporium* LF70 de *Huperzia serrata* produce Huperzina A. *Revista mundial de Microbiología y Biotecnología*, 27, 479-486. doi:10.1007/s/11274-010-0476-6
- Zita Padilla, G. d., Cuervo Usán, Y., y Espadas Reséndiz, M. (n.d.). *Manual de Prácticas de Ingeniería Agrícola UNAM*. Cuautitlan, México: FESCC.

Anexos

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA
MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY



**Revista Mexicana de
Fitopatología** Órgano
Internacional de Comunicación
de la Sociedad Mexicana de
Fitopatología

2 de octubre de 2023

Dr. Rómulo García-Velasco
PRESENTE

Me es grato informarle que hemos recibido el documento electrónico titulado “**Etiology of the peduncle ringing of avocado fruits var. Hass**”, mismo que será sometido a un proceso anónimo por pares de revisión científica y editorial coordinado por la Revista Mexicana de Fitopatología (RMF) para su posible publicación.

Se le asignó la clave: **RMF/2310-3**, con la cual haremos referencia durante el proceso de revisión y será usted el canal de comunicación en su carácter de autor de correspondencia.

Le agradezco la confianza en la RMF, órgano de difusión de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, para la publicación de sus actividades de investigación.

Reciba un atento y cordial saludo,

Atentamente,

Dr. Gustavo Mora
Aguilera Editor en
Jefe

Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.