



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MORELOS

ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DE XALOSTOC

**IDENTIFICACIÓN Y PATOGENICIDAD DEL AGENTE
CAUSAL DE LA MUERTE DESCENDENTE DE RAMAS
EN ÁRBOLES FRUTALES EN CUAUTLA, MORELOS.**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERO FITOSANITARIO**

PRESENTA:

ARACELI ESCOBAR NIÑO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Dagoberto Guillén Sánchez

Codirector: Dr. Daniel Bárcenas Santana

Abril de 2021



DRA. JOSEFINA VERGARA SÁNCHEZ
DIRECTORA DE LA EESX
P R E S E N T E

Por medio del presente, los revisores de la Tesis que lleva por Título: "IDENTIFICACIÓN Y PATOGENICIDAD DEL AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE DESCENDENTE DE RAMAS EN ÁRBOLES FRUTALES EN CUAUTLA MORELOS", que ha realizado la pasante **Araceli Escobar Niño** de la Licenciatura en Ingeniería en Fitosanitaria, otorgamos el **voto aprobatorio** para la impresión de la Tesis por haberse realizado las correcciones consideradas pertinentes de nuestra parte:

| | Nombre | Puesto Firma |
|--------------------------------|---------------|---------------------|
| Dr. Dagoberto Guillén Sánchez | Director | |
| Dr. Daniel Bárcenas Santana | Co director | _____ |
| Ing. Bartolo Jahen Muñoz | Revisor | _____ |
| Dr. Roberto Venado Campos | Revisor | _____ |
| Ing. Juan Martín Lara Gallegos | Revisor | _____ |
| | | _____ |

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

C.c.e Araceli Escobar Niño. Para su conocimiento.
Archivo.

Av. Nicolás Bravo S/N, Interior Parque Industrial Cuautla, Ayala, Morelos. C.P. 62715 Tel: (777) 329 7981 Ext. 6500 y 6501 Email: eesxalostoc@uaem.mx



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAGOBERTO GUILLEN SANCHEZ | Fecha:2020-08-10 12:39:26 | Firmante

PafmuzoJAJp47MEImyWjAvw1XF8ucMimxJ4tGsPn2VbLrmNnbXwL+XJUGOM2bEqQ1Xf5PHXq8Nmg0V99nweyUUo26kbi20GLTLDygALXKDiKMYmhJJWbSMxINTZf6a718pjKjt s6Emc+p1ZNUQfiAGxw05a47K3XlqOPbM+zMoPDushHltjM3pPH4yzYvACh8Xp0RFq+sv+mUo69dvYBZZhwxvNKfLOYvqWtts3HJc/O P2o9vn7U7YLAUIZe3/jHGd3CjD/6CnMx Fk85VftwRQxOQQqdz5WVWYrwtGMhHx5doVnKPwxWBgDtBlcCeMdo2JOGLP7x4YtK188L2dciA==

BARTOLO JAHEN MUÑOZ | Fecha:2020-08-10 12:48:48 | Firmante

e81keKmpbT623XaGG+jjQX3jgwA+r8eonAVZsd+FB8UZIMaAV/p5j6u9n0eZcb9lcdQ2h88DTtggGytXCOrdTZKQx1hCbNd3BYcOkrFaOnYuhpL2IKPTSUQEYnEaqcdGQxcoOnyl 9lkYz4YfwbaACdigHVAsbNZixksD3OH+8epVciwqg2bclMnMASqAS28p+SCTi7dGZWXv8snTAj4o/XfRipnm+clRaHmV3fhTPiK3BRj2/h nDjwChrJxL5bVpLkTY0E59GHfj4vpmnApUrBnLzoc5cy0TEGvQQBv/JmgIXcQi8yrz/5nREpAMgXX7GakKlhjrKYKICcJpOXEAqQ==

ROBERTO VENADO CAMPOS | Fecha:2020-08-10 13:20:33 | Firmante

siNloRj95dw62JTeRv6kumXz2Dv40W1Xcd161t+ANyy0rISyZGhJf4qFGxeWc490BjL9sVcrCtm1w5KTVSkJ8aGGbJ7gNEoxgU3TSNwOzGPAg2/RI6Lr3diVzSqy+fqHeAHPNooH 5xTRHnmfGc5zScxDVpQ1j7wZ79xvmKKmCJsm7pP830trBEF+XubpuSHaWSRyJAc80prt4P5qaKKhf+KtKFzgvQtJyKNYjDpysfu9Nyovj 90zaOC2y8jqKuRbQkYkXKmf4t5bScw+qS+3I8a/eu/zTWzgpfnVDF46XC4mZL9O+aS6XybktnuZwr7EwUAp2LeEHxkbfHlnbrzcw==

DANIEL BÁRCENAS SANTANA | Fecha:2020-08-11 14:11:45 | Firmante

qFNJ0IxbNZSmIB6FkoRUhTE/xjoJr8FDGYQW e188+oXL/0c3DONSUuQjHuOP8R/Ye462CKzrmxPfd77wBL0KKsRCAQ0Wsx8URD7X YKvUw4yACWEHsDhU4x+RHjZ84ia/ct3ik X+SfW1aZrAslwwYIwgEcRxB+WEuMh1+6xbMAMJJHeuSG7KYpWuY+hxt16LJaiecAe/0tsCIDUJAe6aIZKG8NaxbV0BSnPMGsOPDjI6/ lYzVcmksuOaCC6PAZz32cl+Hv2fRQxq LqT8rGW6lp57euQKqhWYl/jVfUn6mPdSUsbJQacTwxjMTZ5YUwTP17tcJnaGHcAW7ojh8mUX+Q==

JUAN MARTIN LARA GALLEGOS | Fecha:2020-08-11 17:22:47 | Firmante

G5L7jiJ72fZtoEFYddQZJllgCQ3YUbgHqgzHDo+kwUtsn6BGqXGbvVbhWYqFxiZoqUhh7iOLOqK7h5wwx9tue/EDEom6krA0YfYg7W+L 5UvsdKOgkNICuT/H0qD0HU7c9WT8z/z Hbp6bm/MpPS50WQTiqn/nPzH+5jlrh2sT+g/3zWNsyCMBh2laBsvLt/gvlsKYL0GjiO6j9v1z1OkKxXprRgAOHleTtX8RIWNdhGwr/EM0VJEI 49oFXbrcms0/zB3Yy5m2+G4u50Gkpo e0E8F3SYgde5KWvOzRC4PC5ZTcHsdH8VhQPD2KJPNrz5s/mei6y3myvNrxRoUJi6A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica oescaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



t03UwC

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/XB4DTAxPBxir9lgAvYevh2pXkyQPCSL9>



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por permitirme seguir con mis estudios y terminar.

Al Dr. Dagoberto Guillen Sánchez, por su amistad, el apoyo mostrado para la realización y culminación del presente trabajo, por sus conocimientos y enseñanzas y aportaciones valiosas.

Al Dr. Daniel Bárcenas Santana, por sus enseñanzas fundamentadas y novedosas, por su paciencia, sugerencias y aportaciones valiosas brindadas durante la realización y culminación del presente trabajo.

A la Lic. Leticia Lira Álvarez por su amistad, por la invitación a la realización de hacer tesis y apoyo para la terminación del presente trabajo.

DEDICATORIA

CON MI MAYOR AGRADECIMIENTO A MIS HERMANOS POR ESTAR SIEMPRE APOYÁNDOME EN TODO MOMENTO Y POR COMPRENDERME.

A MI MADRE CON TODO MI AMOR Y POR SIEMPRE ESTAR AHÍ CUIDÁNDOME EN CADA PASO.

A MI PADRE POR SU APOYO MORAL Y DESEOS DE SUPERACIÓN.

A MI NUEVA FAMILIA POR SU GRANDIOSO APOYO Y POR SIEMPRE ESTAR AHÍ PARA DARME ANIMOS EN CADA MOMENTO.

ÍNDICE GENERAL

| | PAG. |
|--|-------------|
| Índice de figuras | ix |
| Índice de cuadros..... | xi |
| Resumen | xii |
| Abstract | xiii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. OBJETIVOS E HIPOTESIS | 3 |
| 2.1 Objetivo general..... | 3 |
| 2.1.1 Objetivos específicos..... | 3 |
| 2.2. Hipótesis..... | 3 |
| III. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 3.1 Importancia de la fruticultura en México..... | 4 |
| 3.2 Familia Botryosphaeriaceae..... | 4 |
| 3.3 Especies de importancia del género Botryosphaeria..... | 5 |
| 3.4 Géneros de <i>Neofusicoccum</i> | 5 |
| 3.4.1 Importancia | 5 |
| 3.4.2 Descripción morfológica de <i>Neofusicoccum batangarum</i> | 7 |
| 3.4.3 Distribución conocida..... | 7 |
| 3.4.4 Técnicas para su identificación de otras especies..... | 7 |
| IV. MATERIALES Y METODOS | 8 |
| 4.1 Ubicación de la investigación..... | 8 |
| 4.2 Muestreos..... | 8 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3 Aislamiento e identificación morfológica del patógeno..... | 8 |
| a) Siembra directa | 8 |
| b) Cámara húmeda..... | 9 |
| 4.4 Purificación de aislamientos..... | 9 |
| 4.5 Identificación morfológica | 9 |
| 4.6 Extracción de ADN e identificación molecular del patógeno..... | 10 |
| 4.6.1 Análisis filogenético de la secuencia..... | 11 |
| 4.7 Pruebas de patogenicidad en árboles frutales y frutos de aguacate de la var. Hass..... | 11 |
| a) Pruebas de patogenicidad en plantas | 11 |
| b) Pruebas de patogenicidad en frutos | 13 |
| 4.8 Variables a evaluadas en plantas y frutos..... | 14 |
| 4.9 Reaislamientos..... | 14 |
| 4.10 Diseño experimental y análisis estadístico..... | 14 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 15 |
| 5.1 Aislamiento e identificación morfológica del patógeno | 15 |
| 5.2 Identificación molecular del patógeno..... | 17 |
| 5.2.1 Análisis filogenético de la secuencia..... | 18 |
| 5.3 Pruebas de patogenicidad en plantas y frutos..... | 18 |
| 5.3.1 Pruebas de patogenicidad en frutales..... | 18 |
| a) Plantas de aguacate..... | 19 |
| b) Plantas de Ficus..... | 22 |
| c) Plantas de higo..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| d) Plantas de limón Persa..... | 23 |
| e) Plantas de mango..... | 23 |
| 5.3.2 Pruebas de patogenicidad en frutos de aguacate..... | 25 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 27 |
| VII. LITERATURA CITADA..... | 28 |

Índice de figuras

| | Pag. |
|---|------|
| Figura 1. Inoculación con discos de PDA+ micelio de la cepa aislada; (a) corte del tejido de planta de aguacate con bisturí; (b) disco de PDA + micelio de la cepa aislada; (c) colocación del disco de PDA en el tejido de la planta de ficus; (d) Colocación de algodón húmedo con agua destilada y Parafilm en planta de aguacate y (e) Planta de higo inoculada en el invernadero..... | 12 |
| Figura 2. Inoculación con discos de PDA+ micelio de la cepa aislada en frutos de aguacate Hass; (a) Fruto con algodón; (b) Fruto inoculado sin algodón (c) Testigo..... | 13 |
| Figura 3. Patógeno causante de la muerte descendente de las ramas en mango: (a) Cepa de hongo aislada; (b) micelio septado, (c) Conidios hialinos fusiformes y (d) Células conidiógenas con conidios en desarrollo..... | 16 |
| Figura 4. Árbol filogenético generado mediante el método Maximum Likelihood a partir de las secuencias concatenadas de los ITS con los genes TEF1 y BT2. Se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos de dos parámetros de Kimura. Los números en los nódulos indican el valor de 1000 réplicas Bootstrap. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones por sitio (ver escala). a) Árbol filogenético completo generado a partir de las secuencias concatenadas de las especies altamente emparentadas según la herramienta Blast del NCBI. b) Subárbol mostrando únicamente la información correspondiente al grupo de especies de <i>N. batangarum</i> en donde se distingue la diferencia de longitud en la distancia evolutiva entre las especies analizadas y el aislamiento 82..... | 20 |
| Figura 5. Severidad de la muerte descendente causada por <i>N. batangarum</i> en frutales en Morelos, México..... | 21 |
| Figura 6. Pruebas de patogenicidad de <i>N. batangarum</i> en plantas de aguacate; (a) planta testigo sin síntomas; (b) muerte de la rama de aguacate | |

| | |
|--|----|
| inoculada y (c) longitud del avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación..... | 21 |
| Figura 7. Pruebas de patogenicidad de <i>N. batangarum</i> en plantas de ficus; (a) planta testigo sin síntomas; (b) Medición de la longitud del avance de la infección y (c) grietas y muerte de tejido en tallos de ramas de ficus..... | 22 |
| Figura 8. Pruebas de patogenicidad de <i>N. batangarum</i> en plantas de higo; (a) planta testigo sin síntomas; (b) muerte de rama de higo inoculada y (c) longitud del avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación..... | 23 |
| Figura 9. Pruebas de patogenicidad de <i>N. batangarum</i> en plantas de lima persa; (a) planta testigo sin síntomas; (b) cancro en rama de mango inoculada y (c) longitud del avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación..... | 24 |
| Figura 10. Pruebas de patogenicidad de <i>N. batangarum</i> en plantas de mango; (a) planta testigo sin síntomas; (b) cancro en rama de mango inoculada y (c) longitud del avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación..... | 24 |
| Figura 11. Pruebas de patogenicidad en frutos de aguacate variedad Hass; (a) fruto inoculado con disco de PDA+ micelio, pudrición del mesocarpio e infección inicial del pedúnculo; (b) fruto inoculado con disco de PDA + micelio y algodón húmedo, pudrición de mesocarpio y presencia de micelio y (c) tratamiento testigo, fruto inoculado con disco de PDA, mesocarpio sano..... | 26 |

Índice de cuadros

| | Pag. |
|--|------|
| Cuadro 1. Similitud de la amplificación de las secuencias ITS, Ef 1- α y β -tubulina del ADN ribosomal con las depositadas en el GeneBank de los aislamientos de <i>Neofusicoccum</i> spp..... | 17 |

Resumen

La muerte descendente en árboles frutales y forestales es una de las enfermedades más importante que hoy en día limita su explotación. Esta enfermedad es asociada a hongos de la familia Botryosphaeriaceae, aunque estos hongos han sido estudiados, se sabe poco sobre las especies y el daño en árboles frutales. Los objetivos planteados fueron fundamentados en determinar al agente causal de la muerte descendente de ramas y evaluar la patogenicidad en los principales frutales de importancia económica en Morelos. Se tomaron muestras de ramas con síntomas de la enfermedad en una huerta experimental de mango var. Tommy en la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc y se llevaron al laboratorio de fitopatología para su identificación morfológica y molecular. El aislamiento del agente causal se realizó mediante el método de cámara humedad y siembra directa en medio de cultivo PDA. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en plantas de aguacate cv. Hass, ficus, higo, limón persa y mango var. Tommy. Los resultados evidenciaron que el agente causal fue capaz de enfermar a las plantas y a los frutos de aguacate inoculados. Por lo tanto, se reporta por primera vez en México a *Neofusicoccum batangarum* como el agente causal de la muerte descendente de ramas en frutales en el Oriente del estado de Morelos.

Palabras claves: *Neofusicoccum batangarum*, frutales, severidad, muerte descendente.

Abstract

Descending death in fruit and forest trees is one of the most important wood diseases that limits exploitation today. This disease is associated with fungi of the Botryosphaeriaceae family, although these fungi have been relatively studied, little is known about their taxonomy and ecology in fruit trees. The objectives that were set were based on determining the causative agent of the descending death of the branches and evaluating the pathogenicity of the main fruit trees of economic importance in Morelos. Samples were taken from branches with symptoms of the disease in an experimental mango orchard of var. Tommy at Xalostoc School of Higher Studies and they were taken to the plant pathology laboratory for morphological and molecular identification. Isolation of the causative agent was performed using the wet chamber method and direct seeding in PDA culture medium. Pathogenicity tests were carried out on plants of Avocado, Ficus, Fig, Persian limon and mango var. Tommy. As well as avocado fruits of the var. Hass. The results showed that the causal agent was capable of making the inoculated avocado fruits and plants sick. Therefore, *Neofusicoccum batangarum* is reported for the first time in Mexico as the causal agent of the descending death of branches on branches in fruit trees in the eastern state of Morelos.

Key words: *Neofusicoccum batangarum*, fruit trees, severity, descending death.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de frutas es de gran importancia por su contribución en la seguridad alimentaria, la reducción de la pobreza rural y en el desarrollo sostenible de los países desde tres perspectivas: el fortalecimiento de la agricultura familiar, la adaptación y mitigación al cambio climático y el combate a la mala nutrición. Gracias a la amplia diversidad de frutales se puede obtener energía en forma de carbohidratos, proteínas y grasas, también minerales y vitaminas (calorías, vitaminas, grasas, carbohidratos, calcio, hierro, vitamina B, vitamina B12, vitaminas A y vitaminas C) esenciales; además puede constituir una fuente de ingresos importantes para el fruticultor (Llauger, 2016).

En México, en sus diferentes estados se cultiva una gran variedad de frutales en donde 20 cultivos corresponden a clima templado, donde destacan la manzana (*Malus domestica*) con 55,000 ha, tuna (*Opuntia* spp) con 45,974 ha, durazno (*Prunus pérsica*) con 40,252 ha, uva (*Vitis vinífera*) con 26,547 ha y ciruela (*Prunus domestica*) con 14,436 ha. De clima tropical y subtropical se incluyen 35 frutales y los más importantes son aguacate (*Persea americana*) con 112,478 ha, mango (*Mangifera indica*) con 172,284 ha, naranja (*Citrus sinensis*) con 338,336 ha, banano (*Musa acuminata*) con 77,705 ha, limón persa (*Citrus auratifolia*) con 87,937 ha, guayaba (*Psidium guava*) con 21,497 ha, piña (*Ananas comosus*) con 17,079 ha, papaya (*Carica papaya*) con 16,157 ha y mandarina (*Citrus reticulata*) con 15,977 ha. Estas 14 especies de frutales representan el 95 % de superficie plantada con árboles frutales en México. Sin embargo, solo aguacate, mango, limón persa y papaya se exportan a otros países (Sinfruit *et al.*, 2011).

En el estado de Morelos se cultivan alrededor de 125 mil hectáreas con 93 cultivos cíclicos y perennes que generan un valor de la producción anual de más 3,972 millones de pesos, dentro de estos cultivos ocupan un lugar muy importante los frutales, tal es el caso del aguacate, higo, papaya, cítricos y durazno (SIAP, 2019).

El mango (*Mangifera indica* L.), en México se cultiva una superficie de 163,805 hectáreas en los estados de Veracruz, Sinaloa, Chiapas, Nayarit, Oaxaca, Michoacán, Tabasco, Jalisco, Colima, Guerrero, Tamaulipas y San Luis Potosí (Prieto-Martínez *et al.*, 2005). Los genotipos que se cultivan son Kent, Tommy Atinks, Haden, Manila, Ataulfo, Criollo, Sensation y Keitt. La variedad Tommy Atinks es de tamaño grande y forma ovalada; es resistente a daños mecánicos y una vida de anaquel mucho mayor que los demás (Infante, 2011).

El cultivo de mango en Morelos tiene limitantes para su desarrollo dentro de las cuales destacan las plagas y enfermedades, afectando los diferentes órganos de la planta. La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) se considera la enfermedad más importante, caracterizada por la aparición de manchas oscuras en hojas, flores, pedúnculos y frutos (Arias, 2007). Otra de las enfermedades de importancia es la Cenicilla (*Oidium mangiferae*), misma que ataca flores, frutos, brotes nuevos y hojas. Las partes afectadas se cubren de un polvo de color blanquecino o grisáceo. En frutos pequeños, el ataque provoca deformación, amarillamiento y su caída (Mora, 2002). Sin embargo, en los últimos años, se han observado síntomas aéreos de muerte regresiva de brotes y ramas secas que principalmente se le atribuye a *Lasiodiplodia theobromae* o algún género de la familia Botryosphaeriaceae.

En la actualidad se ha reportado a la muerte descendente como una de las principales enfermedades, la cual se asocia a varios hongos de la familia Botryosphaeriaceae. Los hongos de esta familia tienen amplia distribución en el mundo y afectan un grupo diverso de plantas dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas (Mohali, Slippers, & Wingfield, 2006). Los géneros *Botryosphaeria* y *Neofusicocum* infectan el tallo, ramas, hojas y frutos del hospedante (Crous *et al.*, 2006; Mohali *et al.* 2006). En la actualidad la muerte descendente de ramas es importante debido a que afecta directamente a la planta y con ellos merman la producción de estos cultivos perennes, que dependiendo de la etapa fenológica del cultivo pueden ser las pérdidas económicas de la producción y/o el cultivo. Bajo este panorama se planteó la presente investigación.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Con base a lo anterior se plantea la presente investigación con los siguientes objetivos:

2.1 Objetivo general

- Determinar al agente causal de la muerte descendente de ramas en frutales en el Oriente del estado de Morelos.

2.1.1 Objetivos específicos

- Identificar mediante métodos morfológicos y moleculares el agente causal de la muerte descendente de las ramas en frutales en Cuautla, Morelos.
- Evaluar la patogenicidad del patógeno aislado en plantas de los principales frutales de importancia económica en Morelos.

2.2 Hipótesis

- El agente causal de la muerte descendente en el Oriente del estado de Morelos es ocasionado por un hongo y al menos en un frutal inoculado causará la enfermedad y presentará los síntomas observados en campo.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 importancia de la fruticultura en México

En el mercado internacional, México se encuentra como uno de los principales productores y exportadores de frutas, entre las que destacan la naranja, limón, plátano, aguacate, papaya y mango, señalan estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADR) informó que el 2019 cerró con un positivo incremento en la producción de los principales frutales en el país, con relación al 2018. Señaló que en el caso del mango se produjeron 2, 117, 000 ton., 13.4 % más que el año previo anterior, y de plátano, 2, 503 000 ton, un incremento de 6.3%. Además, indicó que la producción de limón terminó el año con 2, 702, 000 ton, aumentó el 6.6%, y naranja con 4, 767, 000 ton, 0.6 % más que en 2018 (AIMX, 2020).

3.2 Familia Botryosphaeriaceae

La familia *Botryosphaeriaceae* comprende especies con una distribución cosmopolita, ataca a monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, específicamente sobre ramas leñosas, hojas, tallos de gramíneas, yemas y en talos de líquenes, comportándose como saprofitos, parásitos y endofíticos, además de que pueden causar síntomas como canchros, gomosis, muerte regresiva o descendente (Denman *et al.*,2000).

Schoch *et al.*, (2006), mencionan que tan solo la clase Dothideomycetes, incluye más de 1500 taxones, considerando teleomorfos y anamorfos. Las especies de esta familia fueron descritas por primera vez como *Sphaeria* (Fries), en 1820, posteriormente en 1863 se introdujo al género *Botryosphaeria* Ces. & De Not. (Cesati y De Notaris, 1863) y se rectificó por Saccardo en 1877 (Crous *et al.*, 2006; Schoch *et al.*, 2006). Los miembros de la familia son patógenos, necrotróficos o saprobios, especialmente en plantas leñosas.

En los últimos años, debido principalmente a la disponibilidad de herramientas moleculares, basadas en el DNA recombinante, ha surgido una

taxonomía más sólida para este grupo de hongos. Hasta hace una década, la posición del género en la clasificación más alta de los ascomicetes no había sido resuelta (Denman *et al.*, 2000), pero de acuerdo con los estudios filogenéticos de Schoch *et al.* (2006), quien señaló que la posición de la familia *Botryosphaeriaceae* en la clase *Dothideomycetes* ha sido enigmática, la situó dentro de *Botryosphaeriales*, un orden nuevo e independiente de los órdenes *Pleosporales* y *Dothideales*. De esta manera en la clasificación actual se reconoce al género *Botryosphaeria* como miembro de la familia *Botryosphaeriaceae* y en el orden *Botryosphaeriales*.

3.3 Especies importantes del género *Botryosphaeria*

Botryosphaeria es un género rico en especies con una distribución cosmopolita, comúnmente asociado con la muerte y los canchros de plantas leñosas (Crous *et al.*, 2006). Hasta el año 2000 el género *Botryosphaeria* agrupaba 143 especies (Denman *et al.*, 2000). Sin embargo, Crous *et al.* (2006), demostraron que dicho género comprende varios linajes filogenéticos diferentes, correlacionados con las características morfológicas de sus anamorfos, por lo que actualmente *Botryosphaeria* es considerado un género relativamente pequeño consistiendo solo de dos especies: *B. dothidea* y *B. corticis* (Demaree & M.S. Wilcox) Arx & E. Müll., esta última confinada a *Vaccinium* spp. (Alves *et al.*, 2008).

3.4 Género *Neofusicoccum*

3.4.1 Importancia

El género *Neofusicoccum* comprende numerosas especies que se encuentran en una amplia gama de huéspedes de plantas de importancia agrícola, forestal, ecológica y económica (Crous *et al.* 2006; Slippers & Wingfield, 2007; Slippers *et al.* 2013). Se reporta que el tipo de infección es predominantemente de conidios. Sin embargo, puede haber infección a través de semillas. El hongo puede permanecer de manera endófito en la planta huésped (Slippers & Wingfield 2007).

El endofitismo puede ser una característica importante ya que estos hongos se pueden mover fácilmente y discretamente en todo el mundo en semillas, esquejes e incluso frutas, e infectar a árboles nativos y no nativos en sus nuevos entornos (Burgess *et al.* 2005; Slippers *et al.* 2013).

Se sabe que *Neofusicoccum* incluye una gran cantidad de especies filogenéticamente muy relacionadas y especies crípticas morfológicamente similares que presentan características fenotípicas como la morfología, aspecto de crecimiento y cultivo inadecuado para la identificación de especies. Por lo tanto, la discriminación de especies es basado en un enfoque de secuenciación multilocus (Pavlic *et al.* 2009a, 2009b).

Dentro de las 29 especies actualmente aceptadas en el género, se sabe que algunas tienen rango de hospedantes geográficamente, mientras que algunos muestran preferencia por hospedantes tal es el caso de *N. parvum* quien fue reportado en 90 especies en 29 países en seis continentes (Sakalidis *et al.* (2013). Por lo contrario *N. eucalypticola* y *N. mangiferae* solo se han reportado en *Eucalyptus* spp. y *Mangifera indica* respectivamente (Phillips *et al.* 2013).

Neofusicoccum en general se encuentra presente en casi todo tipo de plantas leñosas. Por ejemplo, es frecuentemente aislado de eucaliptos (Iturrutxa *et al.*, 2011), almendra (Inderbitzin *et al.* 2010), aguacate (McDonald & Eskalen 2011), nuez (Yu *et al.* 2015), vid (Mondello *et al.* 2013, BerrafTebbal *et al.* 2014), olivo (Triki *et al.*, 2015), arándano (Pérez *et al.* 2014), mango (Ismail y col. 2013), caucho (Ngobisa *et al.* 2013) y durazno (Thomidis *et al.*, 2011). Aunque estos hongos han sido relativamente bien estudiados en cultivos económicamente importantes, se desconoce su prevalencia.

Actualmente 22 especies son reconocidas en *Neofusicoccum* y se han separado sobre la base de dimensiones conidiales y pigmentación, producción de pigmentos en medios de cultivo y datos de secuencia ITS (Espaciadores Internos de transcripto), aunque recientemente se ha cuestionado la importancia taxonómica de algunos de estos caracteres (Abdollahzadeh *et al.* 2013).

3.4.2 Descripción morfológica de *N. batangarum*

N. batangarum presenta conidios picnidiales a los 14 días, micelio abundante, aislado que presenta anillos concéntricos y con forme pasa el tiempo tiende a dispersarse aéreamente en la caja Petri, las células conidiógenas son cilíndrica incolora holoblástica, presentan un septo, pueden ser fusiformes hialinas y ovoides de 15.5 x 5.5 μm (Phillips *et al.*, 2013).

3.4.3 Distribución conocida

Este patógeno se encuentra reportado en Kribi, Camerún (Didier *et al.*, 2010) y Florida, USA (Shetty *et al.*, 2011).

3.4.4 Técnicas para la identificación de otras especies

Basado en los datos de secuencia de ITS y EF1- α , *N. batangarum* está más estrechamente relacionado con *N. ribis* y se puede distinguir de él basándose sólo en cuatro polimorfismos únicos de nucleótidos únicos (SNP) en cuatro regiones de genes (ITS, EF1- α , tubuulin y BOTF15). Puede ser discriminado de otras especies en el complejo *N. ribis* / *N. parvum* por la formación de anillos concéntricos en MEA, una característica que no se ha observado en ninguna otra especie del complejo. Además, los conidios pequeños (15.5 x 5.5 μm , relación L/W a 2.9) distinguen claramente a esta especie de todas las demás especies del complejo *N. ribis* / *N. parvum*. (Kateel *et al.*, 2011) aislaron *N. batangarum* de semillas de *Schinus terebinthifolius* y demostraron que es un patógeno agresivo y agente de biocontrol potencial de este árbol exótico invasor.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación de la investigación

El estudio se realizó en el Campo Experimental de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), en el Laboratorio de fitopatología y en un invernadero, ubicado en Parque Industrial Cuautla, Ayala, Morelos. La parcela tiene una superficie de 6000 m² sin pendientes, localizado en las coordenadas geográficas: 18°49' N de latitud y 99°01' O de longitud, a una altitud 1330 msnm.

4.2 Muestreo

En el campo experimental de la EESX se colectaron muestras de ramas de mango cv. Tommy con síntomas característicos de muerte descendente, marchitez, pérdida de follaje y gomosis. Estas fueron colocadas en bolsas de polietileno y etiquetadas con el sitio y árbol muestreado, las cuales, se colocaron en una hielera para transportarse al laboratorio de Fitopatología de la EESX-UAEM, donde estuvieron en refrigeración para su posterior proceso.

4.3 Aislamiento e identificación morfológica del patógeno

En el laboratorio de fitopatología se realizó el proceso de desinfección de las muestras colectadas, se lavaron con jabón y agua corriente para evitar que esporas o patógenos superficiales se desarrollen en el medio y se puedan tener resultados falsos positivos, posteriormente se procedió a realizar aislamientos de dos formas:

a) Siembra directa

Se cortaron fragmentos de tejido (tallos) de 0.5 cm² con la zona de avance de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 2 min, posteriormente se lavaron dos veces por 1 min con agua destilada estéril y se dejaron secar por 15 min sobre una sanita estéril, para evitar que el exceso de agua favoreciera el crecimiento de bacterias. Una vez secos se colocaron cinco fragmentos en una caja Petri con medio de papa dextrosa agar (Bioxon, PDA 39 g L-1 de agua) se etiquetaron y sellaron. Se incubaron a una temperatura de 25

°C y cuando se observó crecimiento de las colonias se hizo el reaislamiento, posteriormente se realizaron cultivos monospóricos mediante la técnica de punta de hifa en cajas Petri con medio de cultivo PDA para tener las cepas puras (Siller, 2010).

b) Cámara húmeda

Las muestras colectadas fueron colocadas en cámara húmeda y estas se incubaron en el laboratorio hasta observar esporulación o crecimiento micelial a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una muestra con una aguja desinfectada y flameada, se transfirió a una caja Petri con medio de cultivo PDA y se realizaron montajes permanentes para su identificación.

4.4 Purificación de aislamientos

Los aislados obtenidos se purificaron por técnica de punta de hifa y se incubaron por 72 horas a temperatura ambiente. Se realizó una segunda purificación por la técnica de cultivos monospóricos (suspensión de esporas en 10 mL de agua destilada estéril) la mezcla se homogenizó y posteriormente se tomó 1 mL de la suspensión y se dispersó en una caja Petri con medio PDA, las cajas se dejaron incubar a temperatura ambiente para su posterior identificación.

4.5 Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó con base a las características del micelio, colonias, esporas y cuerpos fructíferos, considerando las especificaciones de las claves taxonómicas propuestas por Phillips *et al.*, 2013; Alexopoulos (1985), Sociedad Británica de Micología (British Mycological Society). Se buscó el apoyo de fotografías, dibujos, monografías, publicaciones específicas de revistas de investigación, libros de consulta e internet.

4.6 Extracción de ADN e identificación molecular del patógeno

La extracción del ADN genómico se realizó de acuerdo con el método del bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB). De cada aislado se raspó la superficie usando una espátula de acero inoxidable estéril, el micelio se depositó en un mortero estéril, se le agregó nitrógeno líquido y se maceró con un pistilo y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL con 500 μ L de solución buffer Dellaporta, se mezcló con vórtex por 10 s y se incubó por una hora a 65 °C. Se agregan 700 μ L de Cloroformo-álcohol isoamílico (24:1v/v) posteriormente se pasó por vórtex por 10 s y se centrifugó (Centrifuge 5810 R Eppendorf) a 13 000 g durante 10 minutos. Con una micropipeta, el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo de microcentrifuga de 1.5 mL y se agregó 700 μ L de isopropanol. Los tubos se mezclaron por inversión de cuatro a cinco veces y se almacenaron a -20 °C durante 10 minutos, luego se centrifugó a 13 000 g durante 10 minutos, para sedimentar el DNA y desechar el sobrenadante. Se agregó a cada tubo 500 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó a 13 000 g por 5 minutos y se desechó de nuevo el sobrenadante. En papel absorbente se colocaron los tubos hacia abajo para escurrir el etanol, posteriormente cuando la pastilla esta seca se agrega 100 μ L de agua estéril libre de DNAsa y RNAsa. La calidad y concentración del ADN se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific®, EE.UU.), Finalmente el DNA se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Las regiones que se probaron de acuerdo con la identificación morfológica previa fueron ITS, EF 1- α y β -tubulina mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los iniciadores. Los productos de PCR fueron purificados mediante el protocolo de DNA clean & concentratorTM-5 (Zymo Research, EE. UU.). Dichos fragmentos obtenidos de DNA purificados se mandaron a secuenciar a Corea a la empresa MacroGen®. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos en NCBI con el BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.6.1 Análisis filogenético de la secuencia

Las secuencias se editaron en el programa BIOEDIT 7.2.5 (Hall, 1999) y se compararon contra las bases de datos del GeneBank del NCBI (Benson et al., 2005), con la finalidad de obtener secuencias emparentadas taxonómicamente para cada gen. Las bases de datos generadas fueron alineadas con la herramienta CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), a partir de los alineamientos se determinó el modelo estadístico óptimo para el análisis filogenético con jModelTest v.2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012). Los genes fueron concatenados con el programa Mesquite (Maddison *et al.*, 2019), se obtuvieron secuencias de 1,088 pb constituidos por la información de las secuencias ITS-TEF1-BT2 con una extensión de 484, 282 y 322 pb respectivamente. La construcción de los árboles filogenéticos se realizó en el software MEGA-X (Stecher *et al.*, 2020) a partir los concatenados; se utilizó el método estadístico Maximum Likelihood, con 1000 réplicas bootstrap para evaluar el soporte nodal y el modelo de sustitución de nucleótidos de 2-parámetros de Kimura. Los arboles fueron enraizados con la información de los mismos genes concatenados del basidiomiceto *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*.

4.7 Pruebas de patogenicidad en árboles frutales y frutos de aguacate

De los cultivos monospóricos se procedió a sembrar en cajas Petri con medio de cultivo PDA y se incubaron a temperatura ambiente hasta que el micelio cubriera totalmente la caja y posteriormente este fue la fuente de inóculo para comprobar la patogenicidad.

a) Prueba de patogenicidad en plantas

Para la evaluación de la patogenicidad del agente causante de la muerte descendente de las ramas en frutales se utilizarán plantas provenientes de un invernadero certificado de los siguientes frutales: limón Persa (*Citrus latifolia* Tanaka), mango variedad Tommy (*Mangifera indica*), higo (*Ficus carica*), aguacate Hass (*Persea americana*) y la planta ornamental ficus (*Ficus benjamina*).

La inoculación en los árboles se realizó bajo un diseño completamente al azar con dos los tratamientos (T1= inoculación con discos de PDA + micelio y T2=

testigo) y cuatro repeticiones. Dichas inoculaciones se realizaron en las ramas a una altura conveniente dependiendo del tamaño de la planta. Después de haber desinfectado la zona con hipoclorito de sodio al 1 %, se realizó un corte a la corteza con un bisturí aséptico, abarcando un área de 10 mm²; con un sacabocado se obtuvieron discos de PDA más micelio y con una aguja de disección se extrajeron y se colocaron en el lugar donde se cortó la corteza, se protegió la zona con algodón húmedo y una banda plástica de parafilm a manera de cámara húmeda. Al testigo se le hizo la misma operación, pero la inoculación fue con PDA sin el micelio (Figura 1). Las plantas fueron trasladadas a un invernadero en donde se les dio un manejo agronómico de dos riegos por semana y una fertilización antes de la inoculación con la fórmula 17-17-17.

Transcurridos 30 días se retiró el Parafilm y el algodón, se raspó superficialmente con un bisturí la porción del tallo inoculada, a fin de demarcar y medir en centímetros el avance lineal del patógeno si fuera el caso (Ko, 2004).

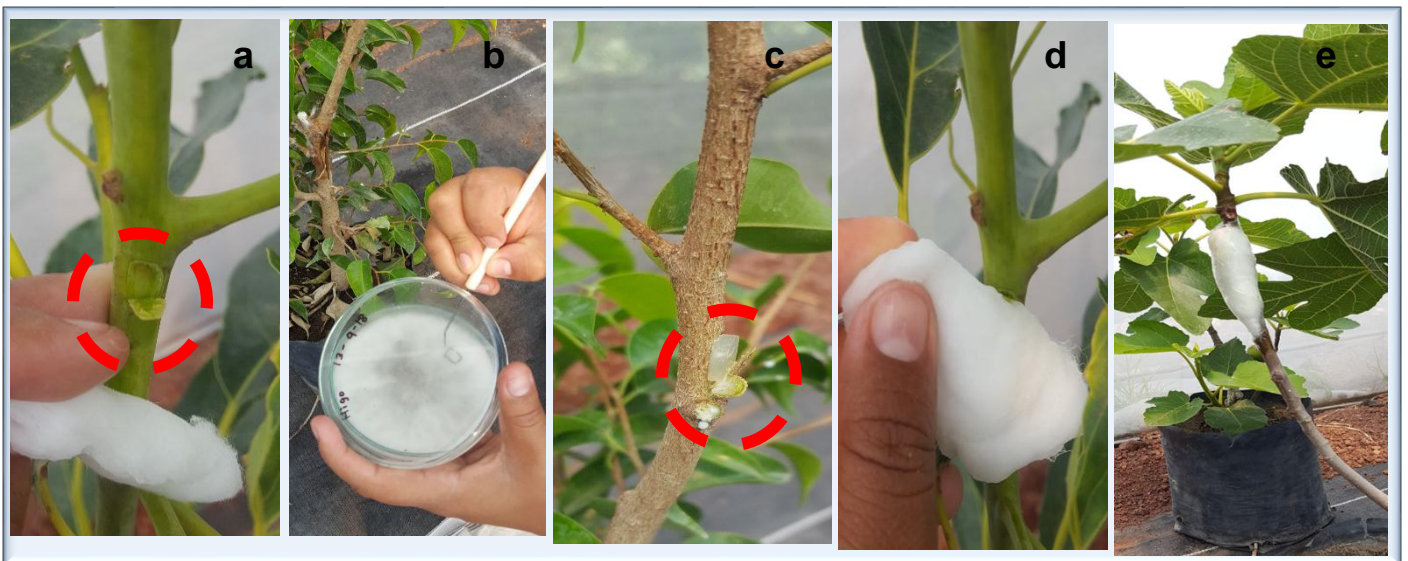


Figura 1. Inoculación con discos de PDA + micelio de la cepa aislada; (a) Corte del tejido de planta de aguacate con bisturí; (b) Disco de PDA + micelio de la cepa aislada; (c) Colocación del disco de PDA en el tejido de la planta de ficus; (d) Colocación de algodón húmedo con agua destilada y Parafilm en planta de aguacate y (e) Planta de higo inoculada en el invernadero.

b) Pruebas de patogenicidad en frutos

Se recolectaron frutos libres de síntomas de enfermedades de aguacate Hass, los cuales, fueron lavados con agua corriente, posteriormente desinfectados en hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos y enjuagados dos veces en agua destilada esterilizada. Los frutos enjuagados se dejaron escurrir y secar durante 15 minutos. Posteriormente fueron seleccionados de acuerdo al tamaño de tal manera que todos los frutos dentro del experimento fueran uniformes en cuanto al tamaño. Los frutos fueron etiquetados y colocados en charolas de unicel de 15 x 10 cm las cuales contenía sanitas y agua destilada estéril. Los frutos fueron inoculados con discos de medio de cultivo de 5 mm de diámetro que contenían micelio del cultivo monospórico. El disco se colocó sobre el tejido intacto (Figura 2).

Las charolas que contenían a los frutos inoculados se colocaron dentro de bolsas de polietileno transparentes de 50 x 70 cm las cuales fueron selladas para proporcionar humedad relativa de 100%. Las charolas fueron incubadas a temperatura de 25°C durante 5 días (Sumerell *et al.*, 2003) (Figura 2).

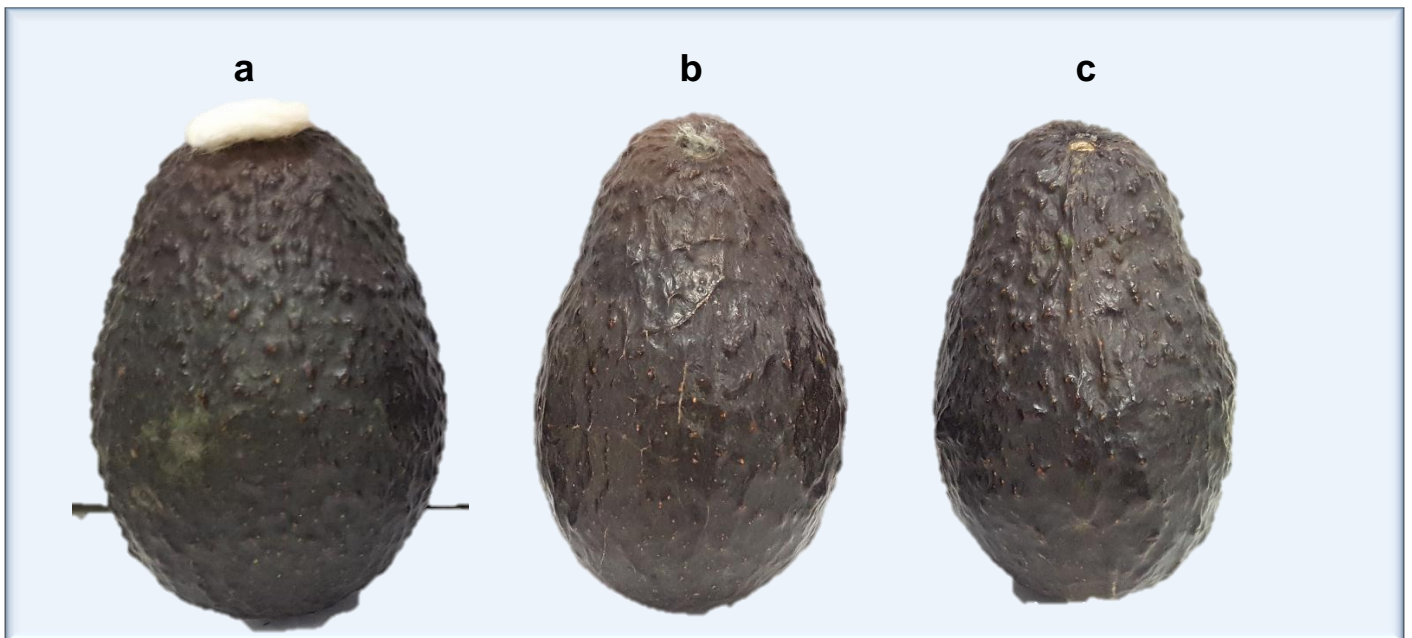


Figura 2. Inoculación con discos de PDA+ micelio de la cepa aislada en frutos de aguacate Hass; (a) Fruto con algodón; (b) Fruto inoculado sin algodón; (c) Testigo.

4.8 Variables a evaluar en plantas y frutos

Para evaluar la patogenicidad se tomó en cuenta la presencia o ausencia de síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas y en los frutos.

La severidad de la enfermedad se evaluó al medir el avance de la infección con un vernier digital (maraca Steren modelo HER-411) a partir de la zona de inoculación tanto en ramas como en frutos.

4.9 Reaislamientos

En cada una de las especies inoculadas se realizaron reaislamientos en medio de cultivo PDA, con la finalidad de verificar que el patógeno que causó los síntomas corresponde al que se inoculó.

4.10 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, con dos tratamientos y cuatro repeticiones, donde la unidad experimental fue una planta. A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), por medio del programa estadístico SAS.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la muerte regresiva de los frutales se observó necrosis de puntas de ramas, muerte de hojas y por ende reducción del follaje y/o muerte total de la planta. Sin embargo, el principal daño se observó en la corteza del tallo debido a que puede provocar canchales de color negro variables, lo cual depende de la corteza del frutal y de la superficie, si las condiciones son favorables, principalmente a humedad relativa alta se pueden observar estromas de color negro que crecen a lo largo del tejido enfermo. Hay veces que es evidente observar el avance de la enfermedad debido a que logra observarse un exudado de color rojo emitido por la planta. Pero es más evidente cuando realizamos un corte el tejido interno, donde se observa necrosis de color café oscuro y es cuando alcanza el xilema. Se ha reportado que esta enfermedad es causada principalmente por especies de la familia Botryosphaeriaceae, tal es el caso de Molina-Gayoso *et al.* (2012), Iturrutxa *et al.* (2011), Gezahgne *et al.*, (2004), y Sandoval-Sánchez *et al.* (2012), quienes reportan la enfermedad de muerte descendente de ramas en aguacate, Eucalipto (*E. globulus*) y mango respectivamente que son los causantes de esta enfermedad, mismas que coinciden con los resultados obtenidos en la investigación.

5.1 Aislamiento e identificación morfológica del patógeno

La cepa aislada tuvo un crecimiento muy rápido, la colonia fue de color blanco y aspecto algodonoso a los tres días. Posteriormente se tornó gris oscuro a negro, con abundante micelio aéreo, septado de color café oscuro (Figura 3); al reverso de la caja de Petri, la coloración fue negra. La cepa a los 15 días presentó estructuras globosas que correspondían a picnidios inmaduros de color negro en medio de cultivo PDA. El aislamiento fue identificado como *Neofusicocum batangarum* Begoude, Jol. Roux & Slippers, debido a que se tuvo presencia de conidios hialinos, fusiformes de 16.72 x 7.31 μm (Figura 3), similar a lo reportado Didier *et al.* (2009) en un estudio realizado en Botryosphaeriaceae asociada al almendro (*Terminalia catappa*) en Camerún, Sudáfrica y Madagascar. Por otra

parte, estudios realizados por Iturritya *et al.* (2011) y De la Mora-Castañeda *et al.* (2014), quienes reportan al género *N. parvum* como el agente causal de la muerte descendente de ramas con las características similares.

Aunque la literatura reporta que para la producción de picnidios es necesario sembrar en un medio especial, el aislamiento presentó la formación de picnidios en medio de cultivo PDA. Sin embargo, Slippers y Wingfield (2007), mencionan que el hongo debe sembrarse en Agua-Agar o en extracto- malta-agar.

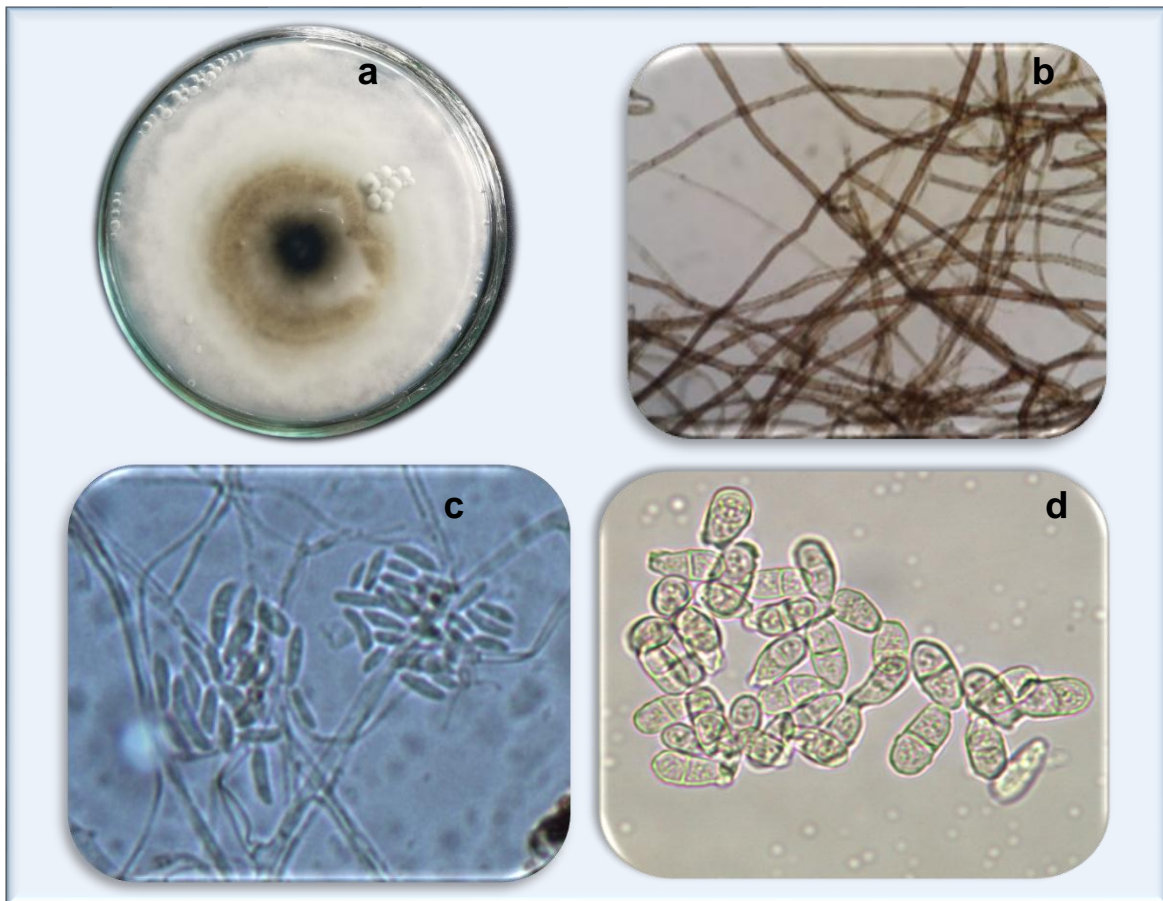


Figura 3. Patógeno causante de la muerte descendente de las ramas en mango: (a) Cepa de hongo aislada; (b) micelio septado, (c) Conidios hialinos fusiformes y (d) Células conidiógenas con conidios en desarrollo.

El agente causal del canker scabby o muerte descendente de rama de frutales, no es muy común debido a que son pocos los lugares donde se encuentra reportado, tal es el caso de las islas menores de Sicilia reportado en pera de cactus. Este hongo no ha sido reportado previamente en Europa, cuya distribución incluye África, Brasil y EE.UU. (Phillips *et al.*, 2013; Conforto *et al.*, 2016; Netto *et al.*, 2017). Sin embargo, en Brasil, *N. batangarum* fue reportado como un patógeno agresivo de anacardo (*Anacardium occidentale*) y cactus de cochinilla (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck, syn. *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill.), un pariente de pera de cactus (Netto *et al.*, 2017; Dissanayake *et al.*, 2016).

5.2 Identificación molecular del patógeno

El análisis molecular confirmó la identificación morfológica de *Neofusicoccum batangarum* como el agente asociados a la muerte regresiva de los frutales en México. La secuencia de la región ITS del ADN ribosomal del aislamiento obtenido reveló que corresponde a esta especie con una similitud del 100% al alinearse a la secuencia HM357636 de Estados Unidos de Norteamérica, Sin embargo, con la secuencia MH500840 registrada en Suiza tiene una similitud del 99% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Similitud de la amplificación de las secuencias ITS, Ef 1- α y β -tubulina del ADN ribosomal con las depositadas en el GeneBank de los aislamientos de *Neofusicoccum* spp.

| Muestra | Marcador | Especie alineada | Similitud (%) | Número de acceso de secuencia alineada | País de la secuencia alineada |
|--------------|-------------------|----------------------|---------------|--|-------------------------------|
| LAN18-BIM-82 | ITS | <i>N. batangarum</i> | 100% | HM357636 | EE.UU. |
| | ITS | <i>N. parvum</i> | 99% | MH500840 | Suiza |
| | EF 1- α | <i>N. batangarum</i> | 98% | MF414781 | Italia |
| | β -tubulina | <i>N. batangarum</i> | 99% | MG979556 | Brasil |

La amplificación de la PCR con los primers específico EF 1- α y β -tubulina corroboraron la identificación de la especie de *N. batangarum* con una similitud de 98 y 99% con las secuencias MF414781 y MG979556 reportadas en Italia y Brasil respetivamente (Cuadro 1).

5.2.1 Análisis filogenético de la secuencia

El análisis filogenético de las secuencias concatenadas (ITS-TEF1-BT2) permitió distinguir claramente diferentes grupos entre la información analizada. El aislamiento fúngico 82 fue asociado con el grupo de especies de *N. batangarum* y altamente emparentado con la cepa *N. batangarum* GB160 (Figura 4a). Aun cuando las especies de *Neofusicoccum* se encuentran altamente emparentadas, el presente análisis filogenético permite observar que la distancia evolutiva del aislamiento fúngico 82 es más amplia que la de las otras especies analizadas (Figura 4b).

5.3 Pruebas de patogenicidad en plantas y frutos

5.3.1 Pruebas de patogenicidad en frutales

Con base a los síntomas y daños observados en campo se inocularon diferentes frutales de importancia agrícola-comercial en Morelos. Los resultados obtenidos fueron de suma importancia debido a que el patógeno aislado fue capaz de causar enfermedad en los frutales inoculados. De acuerdo a las evaluaciones se consideraron diferentes fechas para evaluar el daño en las plantas debido a la severidad que presentaban las plantas. La incidencia y severidad de *N. batangarum* fue evidente en las plantas inoculadas debido a que se les dio las condiciones necesarias para que el hongo fuera capaz de desarrollarse, la incidencia fue del 100%. La severidad fue diferente dependiendo del frutal. De las frutales inoculados el más susceptible fue aguacate quien a los 38 días presentó muerte de la rama y una longitud de avance del tejido dañado de 7.88 cm del punto de inoculación a la base del tallo. Las plantas de higo presentaron muerte de la rama y una longitud de avance la enfermedad de 5.7 cm. Sin embargo, las plantas de mango de la variedad Tommy a los 21 días de evaluación presentaron

un avance de la enfermedad de 4.36 cm. Las plantas que menos avance de enfermedad presentaron fueron Ficus y limón Persa con 1.90 y 0.5 cm respectivamente (Figura 5). Los resultados evidenciaron diferencias estadísticas con el testigo debido a que las plantas testigos no presentaron síntomas y avance de la enfermedad.

a) Plantas de aguacate

Las evaluaciones en las plantas de aguacate se realizaron a los 38 días después de la inoculación debido a que los síntomas fueron evidentes al presentar parte de la rama muerta y en una longitud de avance de la enfermedad en donde presentó un cancro y un exudado blanquecino ubicado a lo largo de la rama (Figura 6). Sin embargo, Ko, 2004, Rodríguez-Gálvez et al., 1999 han reportado estos síntomas en aguacate y mango, pero ocasionados por *Lasiodyplodia theobromae*, ambas especies pertenecen a la familia de las Botryosphaeriaceae y se caracterizan por presentar la misma sintomatología.

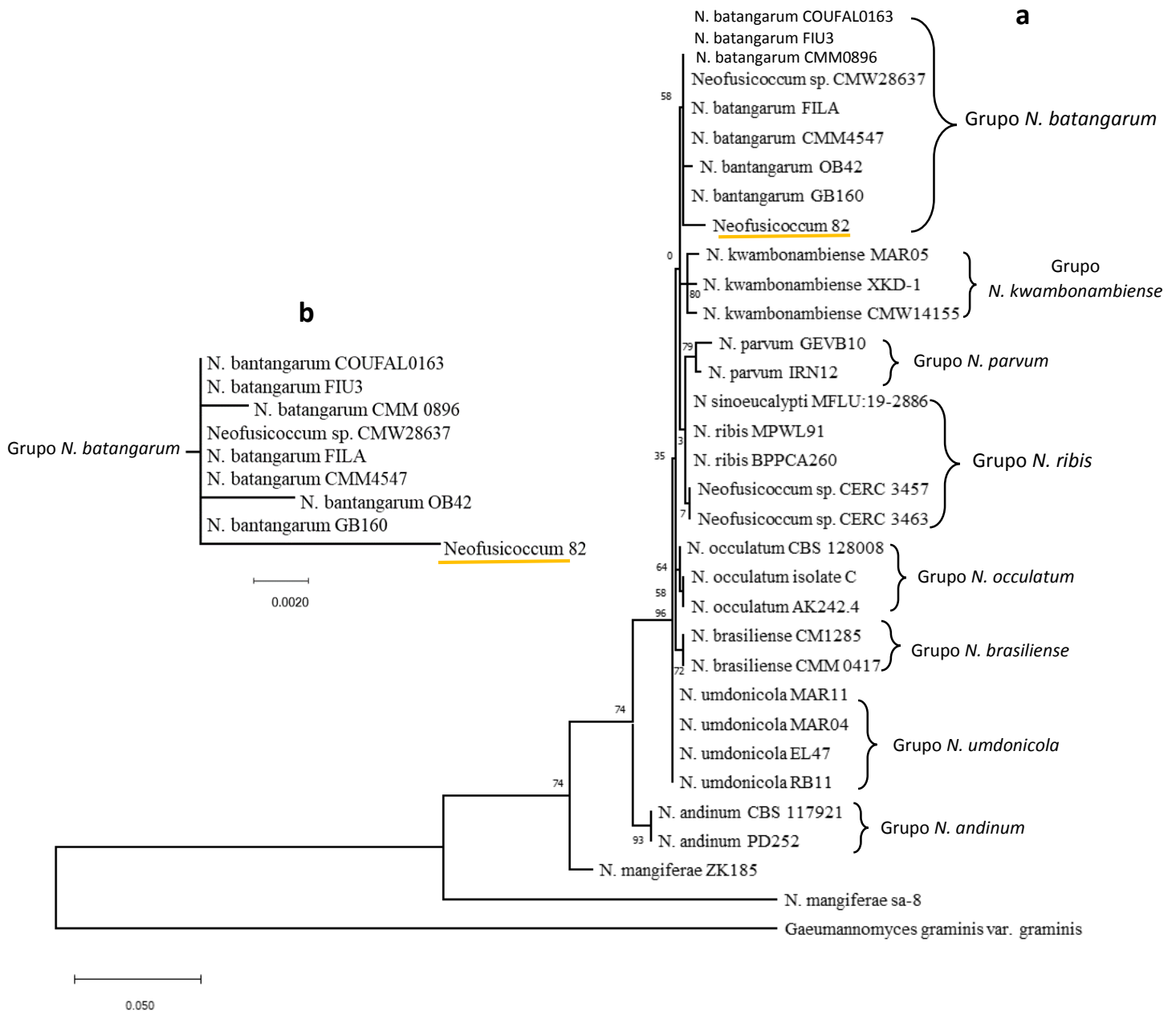


Figura 4. Árbol filogenético generado mediante el método Maximum Likelihood a partir de las secuencias concatenadas de los ITS con los genes TEF1 y BT2. Se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos de dos parámetros de Kimura. Los números en los nódulos indican el valor de 1000 réplicas Bootstrap. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones por sitio (ver escala). **a)** Árbol filogenético completo generado a partir de las secuencias concatenadas de las especies altamente emparentadas según la herramienta Blast del NCBI. **b)** Subárbol mostrando únicamente la información correspondiente al grupo de especies de *N. batangarum* en donde se

distingue la diferencia de longitud en la distancia evolutiva entre las especies analizadas y el aislamiento 82.

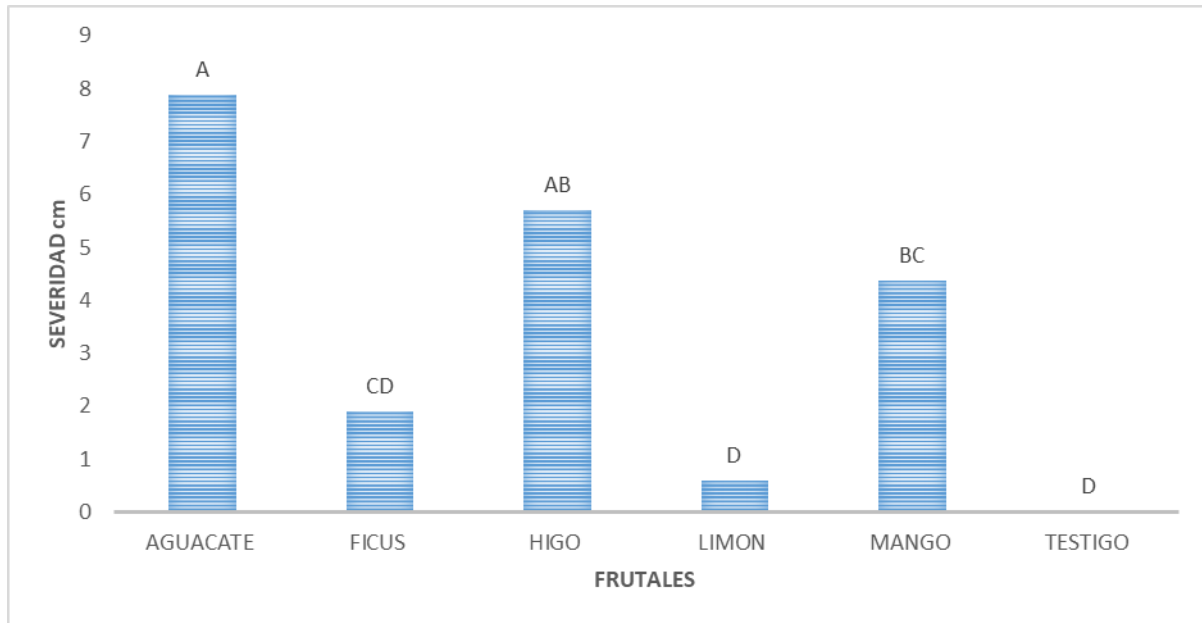


Figura 5. Severidad de la muerte descendente causada por *N. batangarum* en frutales en Morelos, México.

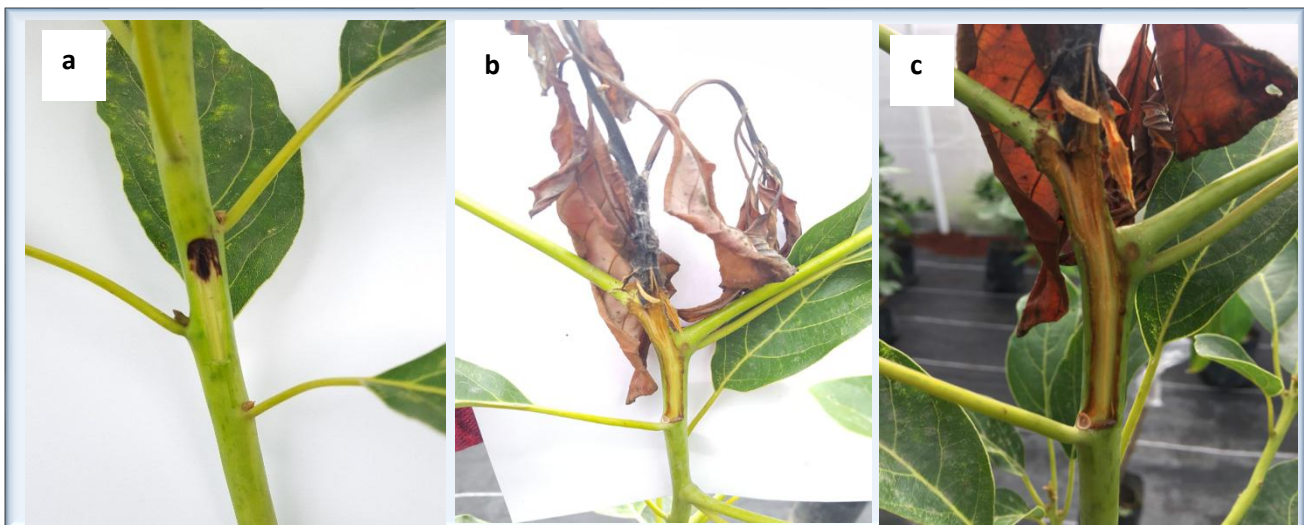


Figura 6. Pruebas de patogenicidad de *N. batangarum* en plantas de aguacate; (a) planta testigo sin síntomas; (b) muerte de la rama de aguacate inoculada y (c) longitud del avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación.

b) Plantas de Ficus

A los 30 días de la inoculación, se observó un leve amarillento en las ramas. Sin embargo, con la finalidad de que lesión se observara más claramente, se llevó a cabo la evaluación a los 45 días. Se encontró agrietamiento de corteza y la lesión necrótica en forma descendente midió 1.90 cm. Las plantas testigo no presentaron lesión alguna (Figura 7).



Figura 7. Pruebas de patogenicidad de *N. batangarum* en plantas de Ficus; (a) planta testigo sin síntomas; (b) Medición de la longitud del avance de la infección y (c) grietas y muerte de tejido en tallos de ramas de ficus.

c) Plantas de higo

Las plantas de higo inoculadas fueron muy susceptibles debido a que a los 15 días presentaron los síntomas característicos de la enfermedad como son muerte descendente de ramas incluso follaje adherido que se torna de color marrón (Figura 8). Esto se debe principalmente por que el tejido es semi-leñoso y al afectar los vasos conductores produce la reducción de sustancias nutritivas y agua a la parte afectada por ello la marchitez inmediata.

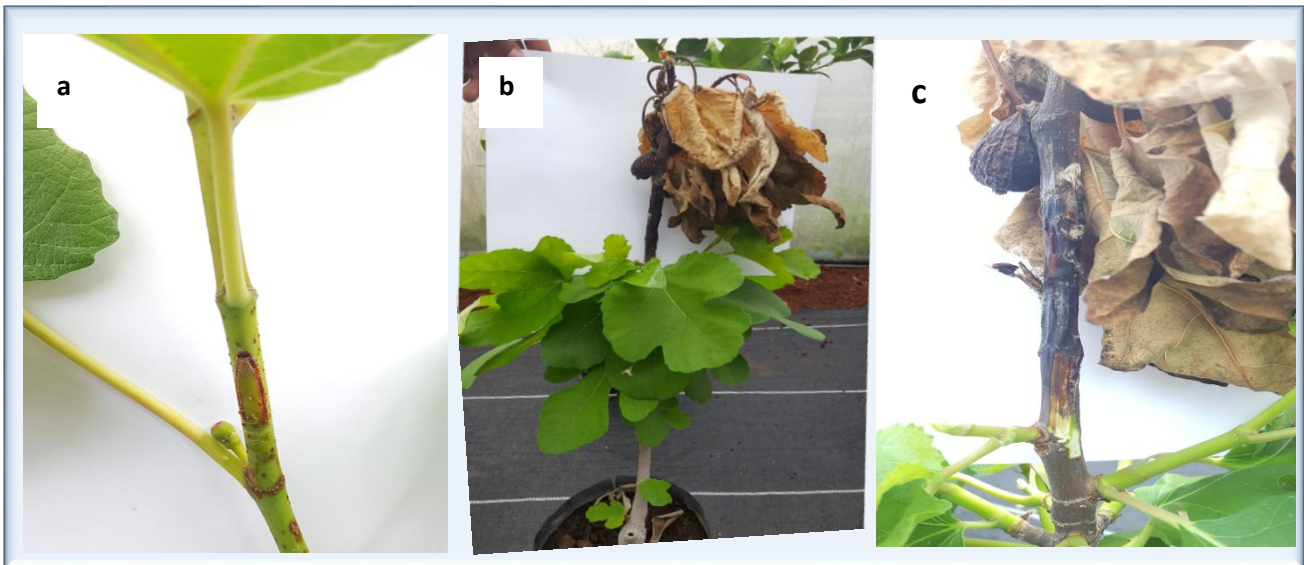


Figura 8. Pruebas de patogenicidad de *N. batangarum* en plantas de higo; (a) planta testigo sin síntomas; (b) muerte de rama de higo inoculada y (c) longitud del avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación.

d) Plantas de limón Persa

Las plantas de limón persa que fueron inoculadas en general presentaron síntomas poco evidentes debido a que la longitud del avance de la enfermedad fue de 0.5 cm. Sin embargo, si hubo necrosis del tejido, quizá en esta frutal el patógeno le lleve más tiempo causar enfermedad (Figura 9).

e) Plantas de mango

Las plantas de mango de la variedad Tommy inoculadas con *N. batangarum* presentaron una longitud intermedia de infección, era evidente tener este resultado ya que *N. batangarum* fue aislado de la plantación de mango en estudio. Dicha enfermedad se presentó en la huerta en manchones por lo que es fácil de ubicar. Sin embargo, es necesario hacer el diagnóstico debido a que la muerte descendente se le ha atribuido a *Lasiodiplodia theobromae*. *N. batangarum* presentó pudrición de tejido y en algunos casos presentó micelio y algunos picnidios (Figura 10).



Figura 9. Pruebas de patogenicidad de *N. batangarum* en plantas de lima persa; (a) planta testigo sin síntomas; (b) cancro en rama de mango inoculada y (c) longitud del avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación.

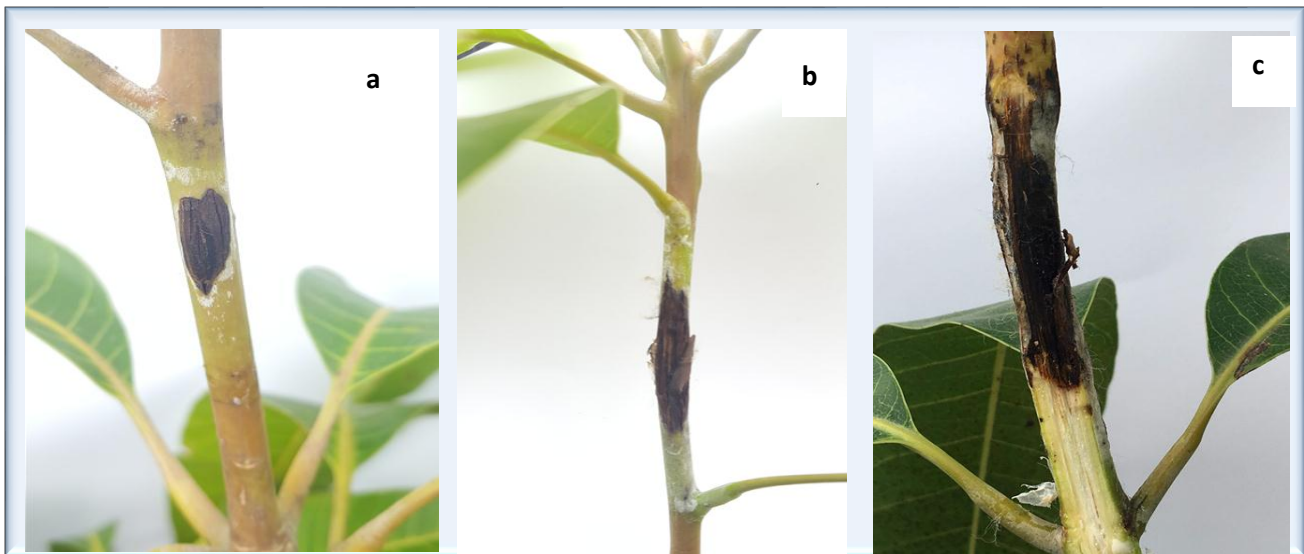


Figura 10. Pruebas de patogenicidad de *N. batangarum* en plantas de mango; (a) planta testigo sin síntomas; (b) cancro en rama de mango inoculada y (c) longitud del avance de la enfermedad a partir del punto de inoculación.

En México no existen reportes de *N. batangarum* como agente causal de la muerte descendente de ramas en frutales por ello no hay mucho que discutir. Sin embargo, ya existen reportes de este hongo afectando principalmente plantas forestales. Por ello fue importante evaluar a los frutales para ver qué tan agresivo puede ser este patógeno.

5.3.2 Pruebas de patogenicidad en frutos de aguacate

Con base a la severidad que se presentó en las plantas se decidió inocular frutos de aguacate debido a que es uno de los frutos en donde más del 80% de la producción se exporta. Los frutos inoculados se evaluaron a los 8 días después de la inoculación. Los frutos presentaron una pudrición color café claro a oscuro, se originó alrededor del pedúnculo y se extendió a lo largo de él con márgenes ondulados, en donde el mesocarpio presento pudrición color café a negra con crecimiento micelial (Figura 11). Resultados similares han sido reportados en otros hospedantes como mango, Rodriguez-Galvaez (2003), coincide en que, el inicio de la infección se inicia a través del pedúnculo del fruto. Alama *et al.* (2006), reporta los mismos síntomas observados, pero al inocular a *Lasiodiplodia theobromae* en las condiciones de Perú.



Figura 11. Pruebas de patogenicidad en frutos de aguacate variedad Hass; (a) fruto inoculado con disco de PDA + micelio, pudrición del mesocarpio e infección inicial en el pedúnculo; (b) fruto inoculado con disco de PDA + micelio y algodón húmedo, pudrición de mesocarpio y presencia de micelio y (c) tratamiento testigo fruto inoculado con disco de PDA, mesocarpio sano.

VI. CONCLUSIONES

- Con base a la caracterización morfológica, molecular y las pruebas de patogenicidad, el agente causal de la muerte descendente de ramas de frutales en el Oriente del estado de Morelos corresponde a *Neofusicoccum batangarum*.
- En México es el primer reporte que se tiene sobre *Neofusicoccum batangarum* asociado a la muerte descendente en frutales.
- Con base en las pruebas de patogenicidad *Neofusicoccum batangarum* causó enfermedad en plantas de aguacate, ficus, higo, limón persa y mango var. Tommy.
- Se recomienda que se realicen pruebas de efectividad para determinar algún fungicida para su control y tomar las medidas necesarias para combatir a *Neofusicoccum batangarum* en tiempo y en forma para evitar alguna epidemia.

VII. LITERATURA CITADA

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi, G.E., Zare, R. and Phillips, A.J.L. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.
- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A. & Phillips, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1–13.
- Alama, I., Maldonado, E. y Rodríguez, E. 2006. *Lasiodiplodia theobromae* afectando el cultivo de palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Universalia* 11(2): 15-21.
- Arias, B. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica*) en pre y poscosecha en el municipio de Cedeño, estado Monarcas, Venezuela, Biagro-Universidad Centro-Occidental Lisandro. ISSN 1316-3361. Pág. 20.
- Burgess, T.I., Barber, P.A. & Hardy G.E.St.J. 2005. *Botryosphaeria* spp. asociado con eucaliptos en Australia Occidental, incluyendo la descripción de *Fusicoccum macroclavatum* sp. *Australasian Plant Pathology*. 34: 557-567.
- Cesati, V. and Notaris, G. 1863. Schema di classificazione degli sferiacei italici aschigeri piu' o meno appartenenti al genere Sphaeria nell'antico significato attriboglide. *Persoon Commentario della Società Crittogamologica Italiana* 1(4):177-240
- Conforto, C., Lima, N.B., Garcete, G.J.M., Cámara, M.P.S. y Michereff, S.J. 2016. Primer reporte de cladode mancha marrón en pera espinosa cactus causada por *Neofusicoccum batangarum* en Brasil. *Plant Disease* 100: 1238. doi: 10.1094/PDIS-11-15-1298-PDN.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Phillips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. & Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol* 55:239–257.

- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., & Posada D. 2012. jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Denman, S., Crous, P.W., Taylor, J.E., Kang, J.C., Pascoe, I. y Wingfield, M.J. 2000. Una visión general de la historia taxonómica de *Botryosphaeria* y una reevaluación de sus anamorfos basados en morfología y filogenia de ADN. *Studies in Mycology* 45:129-140.
- Didier, B.B.A., Slippers, B., Wingfield, M.J. y Roux, J. 2010. *Botryosphaeriaceae* asociado con *Terminalia catappa* en Camerún, Sudáfrica y Madagascar. *Progreso Micológico* 9: 101-123.
- Dissanayake, A.J., Camporesi, E., Hyde, K.D., Phillips, A.J.L. & Fu, C.Y. 2016. *Dothiorella* species associated with woody hosts in Italy. *Mycosphere* 7: 51–63.
- Gezahgne, A., Roux, J., Slippers, B., & Wingfield M. J. 2004. Identification of the causal agent of *Botryosphaeria* stem canker in Ethiopian eucalyptus plantations. *South African Journal of Botany*, 70(2), 241–248. Obtenido de http://www.fabinet.up.ac.za/publication/pdfs/5852004_gezahgne_roux_slippers_wingfield_sa_j_bot.pdf
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Trouillas, F.P. y Michailides, T.J. 2010. Una filogenia de seis locus revela una alta diversidad de especies en *Botryosphaeriaceae* de almendras de California. *Mycologia* 102:1350-1368.
- Infante, F., Quilantan, J., Rocha, F., Esquinca, H., Castillo, A., Ibarra, N.G. y Palacio, V. 2011. Mango Ataulfo: Orgullo chiapaneco. *CONABIO. Biodiversitas*, 96:1-5.
- Iturrity, E., Slippers, B.N., Mesanza, & Wingfield, M.J. 2011. First report of *Neofusicoccum parvum* causing canker and die-back of *Eucalyptus* in

- Spain. Australasian Plant Disease. 6:57–59. doi: 10.1007/s13314-011-0019-5.
- Ismail, A.M., Cirvilleri G., Lombard, L., Crous, P.W. & Groenewald, J.Z. 2013. Characterisation of *Neofusicoccum* species causing mango dieback in Italy. Journal of Plant Pathology 95:549–557.
- Kateel, G., Minnis, M.A., Rossman, Y.A. y Krishnaswamy, J. 2011. El patógeno de semillas de peppertree brasileño, *Neofusicoccum batangarum*, un potencial agente de biocontrol. Control Biológico 56: 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.09.016>.
- Llauger, E.R. 2016. La fruticultura y el desarrollo sostenible. FAO. Sitio web: <http://www.fao.org/cuba/noticias/detail-events/en/c/412715/>. Consultada 2/08/18.
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2019. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61. <http://www.mesquiteproject.org>
- McDonald, V. y Eskalen, A. 2011. Especies de Botryosphaeriaceae asociadas con cankers de ramas de aguacate en California. Plant Disease 95:1465-1473.
- Mohali, S., Slippers, B. y Wingfield, M.J. 2006. Dos nuevas especies de *Fusicoccum* de Acacia y Eucalyptus en Venezuela, basadas en morfología y datos de secuencias de ADN. Mycological Research 110:405-413.
- Molina-Gayosso, E., Silva-Rojas, H.V., García-Morales, S., & Ávila-Quezada, G. 2012. First report of black spots on avocado fruit caused by *Neofusicoccum parvum* in Mexico. Plant Disease 96(2):287. doi: 10.1094/PDIS-08-11-0699.
- Mora, M.J., Gamboa, P.J. y Elizondo, M.R. 2002. Guía para el cultivo del mango. Guia para el cultivo de mango, INTA, 44 p.
- Mora-Castañeda, J.G., Cibrián-Tovar, D. y Pérez-Vera, O.A. 2014. *Neofusicoccum eucalyptorum* (= *Botryosphaeria eucalyptorum*) Y *N. parvum*: patógenos en plantaciones de eucalipto en México. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 187-197. doi: 10.5154/r.rchscfa.2014.03.012

- Ngobisa, A.I.C.N., Abidin, M.A.Z., Wong, M.Y. & Wan, N.M. 2013. *Neofusicoccum ribis* associated with leaf blight on rubber (*Hevea brasiliensis*) in Peninsular Malaysia. *Plant Pathology Journal* 29:10-16.
- Netto, M.S.B., Lima, W.G., Correia, K.G., Da Silva, C.F.B., Thon, M., Martins, R.B., Miller, R.N.G., Michereff, F.J. y Cama, M.P.F. 2017. Análisis de filogenia, distribución y patogenicidad de las especies de Botryosphaeriaceae asociadas con gummosis de *Anacardium* en Brasil, con una nueva especie de *Biol fúngico* 121:437-451. doi: 10.1016/j.funbio.2016.07.006.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A. y Wingfield, M.J. 2009a. Caracterización molecular y fenotípica de tres especies filogenéticas descubiertas dentro del complejo *Neofusicoccum parvum/N. ribis*. *Mycologia* 101: 636-647.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A. & Wingfield, M.J. 2009b. Molecular and phenotypic characterisation of three phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum / N. ribis* complex. *Mycologia*. doi:10.3852/08193 in press.
- Pérez, S.F., Merino, G.C. & Guerrero, J.C. 2014. Detection of *Neofusicoccum nonquaesitum* causing dieback and canker in highbush blueberry from Southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14:581–588.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z. y Crous, P.W. 2013. Las Botryosphaeriaceae: Genera y especies conocidas a partir del cultivo. *Estudia Mycol.* 76:51-167. doi: 10.3114/sim0021.
- Prieto-Martínez, J.J., Covarrubias-Alvarado, J.E., Romero-Cadena, A. y Figueroa-Viera, J. 2005. Paquete tecnológico para el cultivo de mango en el estado de colima. Secretaria de Desarrollo Rural. Colima, Colima. 52 p.
- Rodríguez-Gálvez, E. 2003. Muerte regresiva del mango. Ed. Filmart Pueblo Libre-Lima. 28 p.

- Saccardo, P. A. 1877. Fungi Veneti novi vel critici vel Mycologiae Venetae addendi, ser. VI Michelia, 1:1-72.
- Sandoval-Sanchez, M., Nieto-Angel D., Sandoval, I.S., Téliz-Ortiz D. y Orozco-Santos, M. 2012. Fungi associated to stem-end rot and dieback of mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-73.
- Schoch, C.L., Shoemaker, R.A., Seifert, K.A., Hambleton, S., Spatafora, J.W. y Crous, P.W. 2006. Una filogenia multigene de los Dothideomycetes usando cuatro loci nucleares. *Mycologia* 98: 1041-105.
- SIAP. 2019. Producción agrícola. Cíclicos y Perennes 2019. Riego + Temporal. Resumen Cultivos. <http://www.siap.gob.mx/ventana>. Consultada 23/05/2019.
- Shetty, K.G., Minnis, M.A., Rossman, A.Y. y Jayachandran, K. 2011. El patógeno de semillas de peppertree brasileño, *Neofusicoccum batangarum*, un potencial agente de biocontrol. *Control Biológico* 56:91-97.
- Sinfruit, P., Villegas, A., y Mora, A.A. 2011. Avances de la fruticultura en México. 01/08/10, de SCIELO Sitio web: <http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33nspe1/a21v33nspe1.pdf>
- Slippers, B., Smit, W.A., Crous, P.W., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D. & Wingfield M.J. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology* 56:128-139.
- Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A.J.L., Groenewald, J.Z. y Wingfield, M.J. 2013. Linajes filogenéticos en los Botryosphaeriales: Un marco sistemático y evolutivo. *Studies in Mycology* 76:31-49.
- Stecher, G., Tamura, K. & Kumar, S. 2020. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) for macOS. *Mol. Biol. Evol.* 37(4):1237-1239. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz312>

- Thomidis, T., Michailides, T.J. & Exadaktylou, E. 2011. *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 131:661-668.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22):4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Yu, Z., Tang, G., Peng, S., Chen, H. & Zhai, M. 2015. *Neofusicoccum parvum* causing canker of seedlings of *Juglans regia* in China. *Journal of Forestry Research* 26:1019-1024.