



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Parasitología Agrícola



MAESTRÍA EN CIENCIAS DE PROTECCIÓN VEGETAL

Departamento de Parasitología Agrícola

**PATOGENICIDAD DE HONGOS ASOCIADOS A ESCARABAJOS
AMBROSIALES Y SUSCEPTIBILIDAD EN GENOTIPOS DE AGUACATE.**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PROTECCIÓN VEGETAL

Presenta:

ALEJANDRA BARRIENTOS MARTÍNEZ

BAJO LA SUPERVISIÓN DEL: DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO A JUNIO DE 2020



APROBADA



TESIS REALIZADA POR ALEJANDRA BARRIENTOS MARTÍNEZ BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ ASESOR INDICADO, APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



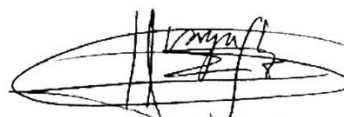
DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:



DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO

ASESOR:



DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. MOISÉS CAMACHO TAPIA

Contenido

CONTENIDO	III
Lista de cuadros	V
Lista de figuras	VI
Agradecimientos	IX
Datos biográficos	X
Resumen general	XI
General Abstract	XII
CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL	13
1.1 Objetivos	15
1.1.1 Objetivo generales	15
1.1.2 Objetivos particulares	15
1.2 Hipótesis	15
CAPITULO 2. REVISION DE LITERATURA	16
2.1 Importancia económica	16
2.2 Plagas y enfermedades de importancia económica en el aguacate	16
2.2.1 Enfermedades cancos	18
2.2.2 Escarabajos ambrosiales, hongos simbiotes y enfermedades asociadas	18
2.3 Literatura citada	21
CAPITULO 3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE HONGOS EN PLANTAS DE AGUACATE 'HASS' RELACIONADOS A COMPLEJOS AMBROSIALES	27
3.1 Resumen	27
3.2 Abstract	28
3.3 Introducción	28
3.4 Materiales y Métodos	30
3.4.1 Incremento de hongos	31
3.4.2 Pruebas de patogenicidad	31

3.4.3 Re-aislamiento del patógeno	32
3.4.4 Identificación molecular de los hongos fitopatógenos	32
3.5 Resultados	34
3.6 Discusión	44
3.7 Conclusiones	49
3.8 Agradecimientos	49
3.9 Literatura Citada	50
Capítulo 4. Susceptibilidad de variedades de aguacate a hongos asociados con complejos ambrosiales	53
4.1 Resumen	53
4.2 Abstract	53
4.3 Introducción	54
4.3 Materiales y Métodos	55
4.3.1 Hongos	55
4.3.2 Incremento de hongos	56
4.3.3 Genotipos de aguacate	56
4.4.4 Evaluación de genotipos	58
4.4.5 Reaislamiento del patógeno	59
4.4.6 Diseño Experimental y de tratamientos	59
4.5 Resultados	59
4.5.1 Observaciones externas de síntomas	59
4.5.2 Observaciones de daños internos	62
4.5.3 Análisis de varianza	63
4.5.4 Factor hongo	64
4.5.5 Factor genotipo de aguacate	65
4.6 Discusión	68
4.7 Conclusiones	76
4.8 Agradecimientos	76
4.9 Literatura Citada	77

Lista de cuadros

Cuadro 1. Genotipos de aguacate inoculados con hongos asociados a escarabajos ambrosiales	55
Cuadro 2. Síntomas externos presentados en plantas de genotipos de aguacate después de inoculación de hongos asociados a escarabajos ambrosiales.	60
Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza de hongos asociados a escarabajos ambrosiales inoculados en genotipos de aguacate.	64
Cuadro 4. Avance de daños internos en los tallos de aguacate por hongos asociados a escarabajos ambrosiales.	65

Lista de Figuras

- Figura 1** Árbol del mejor modelo Kimura-2P x ML de la alineación de la secuencia (ITS) del hongo proveniente de Chiapas asociado al barrenador ambrosial *Microcorthylus vescus*. La barra de escala muestra 0.02 sustituciones por sitio, los valores de “Bootstrap” de 1000 réplicas se muestran al lado de las ramas. La muestra del aislado corresponde al nombre de C2.....35
- Figura 2** Colonias de hongos y sintomatología en invernadero. 1) *Fusarium solani*, 2) *Fusarium* sp., 3) *Raffaelea brunnea*, 4) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce1, 5) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce2, 6) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce3, 7) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce4, 8) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce5. Las imágenes son referentes a) Colonia en PDA, excepto *R. brunnea* en CSMA, a los 7 días a temperatura ambiente y b) Herida a los 15 días de inoculación39
- Figura 3** Cortes longitudinales de var. Hass. Cortes longitudinales de var. Hass. 1 *Fusarium solani*, 2 *Fusarium* sp., 3 *Raffaelea brunnea*, 4 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce1, 5 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce2, 6 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce3, 7 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce4, 8 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce5. Las imágenes son referentes a) Sintomatología en hojas a los 30 días y b) cortes longitudinales del tallo mostrando el avance del daño de la enfermedad a los 30 días.40
- Figura 4** Avance del daño longitudinal por hongos asociados a barrenadores ambrosiales en brote maduro de aguacate ‘Hass’. Letras distintas significan diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (DMS) a una $P=0.05$41
- Figura 5.** Avance del daño longitudinal por hongos asociados a barrenadores ambrosiales en brote tierno de aguacate ‘Hass’. Letras distintas significan

diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (DMS) a una $P=0.05$	42
Figura 6. Avance transversal el daño de los hongos dentro del tallo de aguacate 'Hass'. Letras distintas significan diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (DMS) a una $P=0.05$	43
Figura 7. Avance promedio total del daño interno de los tipos de brote y los tipos de daño de los hongos en aguacate 'Hass'.	44
Figura 8 Sintomatología externa en aguacate. 1) 'Hass', 2) 'Méndez No.1', 3) 'Pionero', 4) 'HxP 83' de los hongos a) <i>Ophiostoma</i> sp., b) <i>Fusarium</i> sp., c) <i>Raffaelea brunnea</i>	61
Figura 9 Daños internos en variedades de aguacate 1) 'Hass, 2) 'Méndez No.1', 3) 'Pionero', 4) 'HxP 83' de los hongos a) <i>Ophiostoma</i> sp., b) <i>Fusarium</i> sp., c) <i>Raffaelea brunnea</i> , d) <i>Raffaelea brunnea</i> , corte longitudinal completo donde se muestra que el avance del daño interno se limita solamente al tejido de la médula en 'HxP 83'.....	63
Figura 10 Avance de daño longitudinal en tallo maduro en genotipos de aguacate inoculados con hongos asociados a escarabajos ambrosiales. Medias con letra diferente indican diferencia de acuerdo con la prueba de Fisher LSD a una $P=0.01$	66
Figura 11 Avance de daño longitudinal en tallo tierno en genotipos de aguacate inoculados con hongos asociados a escarabajos ambrosiales. Medias con letra diferente indican diferencia de acuerdo con la prueba de Fisher LSD a una $P=0.01$	67
Figura 12. Avance de daño transversal en tallos de genotipos de aguacate inoculados con hongos asociados a escarabajos ambrosiales. Medias con letra diferente indican diferencia de acuerdo con la prueba de Fisher LSD a una $P=0.01$	68

Figura 13 Daño causado por <i>Fusarium</i> sp. asociado al escarabajo ambrosial <i>Mycocorthyus vescus</i> , en Lázaro Cárdenas, la Trinitaria, Chiapas, México	72
Figura 14. Daño causado por <i>Fusarium</i> sp. asociado al escarabajo ambrosial <i>Mycocorthyus vescus</i> , donde causa secamiento completo de la planta y llega al tronco principal por muerte descendente. Lázaro Cárdenas, la Trinitaria, Chiapas, México.	73

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Chapingo, como máxima casa de estudios en materia agronómica por permitirme continuar con mi crecimiento académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), el cual me proporcionó una beca durante el periodo de estudios de maestría.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir quien confió en mi otorgándome la oportunidad de ser dirigida por él, motivándome siempre con palabras optimistas y de gran aliento.

Al Dr. Alejandro F. Barrientos Priego, quien me guió y proporcionó un gran apoyo, así como su valioso tiempo en la realización de esta investigación.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández, por su acertada opinión en la asesoría estadística.

Al Dr. Moisés Camacho Tapia por su apoyo en la obtención de información en esta tesis.

A Itzel Silvestre por su valiosa ayuda, así como amistad en la realización de mi investigación.

A José Roberto Bermúdez Barrientos por su apoyo con la construcción de la filogenia.



Datos biográficos

La autora del presente trabajo, Licenciada en Biología ALEJANDRA BARRIENTOS MARTÍNEZ, nació el 22 de agosto de 1991 en la ciudad de Texcoco Edo. de México. Realizó estudios de Educación Superior en la Universidad Simón Bolívar ubicada en el D.F, donde cursó la carrera de Licenciada en Biología durante el periodo de 2011 a 2015. Realizó la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo durante el período 2018 -2020.

Resumen general

PATOGENICIDAD DE HONGOS ASOCIADOS A ESCARABAJOS AMBROSIALES Y SUSCEPTIBILIDAD EN GENOTIPOS DE AGUACATE

En estudio se realizaron pruebas de patogenicidad en aguacate 'Hass', de hongos relacionados a complejos ambrosiales, donde se evaluó su sintomatología, y el avance del daño dentro del tallo, después de la inoculación de aislamientos provenientes de árboles de aguacate enfermos provenientes del estado de Michoacán y Chiapas, México. Los hongos estudiados fueron los siguientes: *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), *Fusarium solani*, y *Fusarium* sp, en los que con excepción de *R. brunnea* se realizó su identificación molecular por medio de PCR y secuenciación. Evaluaciones de las cuales destacaron en patogenicidad *R. brunnea* y *Fusarium* sp., con un mayor avance dentro del tallo y daño que en algunos casos llegó hasta el tejido de médula, mostrando marchitez en las hojas y manchado café rojizo en el interior del tallo. Posteriormente a estas pruebas de patogenicidad se realizó una selección por medio de los resultados obtenidos de los mejores hongos y cepas a evaluar en la siguiente fase experimental. Como complemento a las anteriores pruebas se evaluó el comportamiento y susceptibilidad de los hongos seleccionados los cuales fueron inoculados en ocho variedades ('Hass', 'Pionero', 'Méndez No.1', 'Encinos', 'Maluma', 'Pinkerton', 'HxP 83', 'Fundación II') y una raza pura ('Olanca 3 S1') de *Persea americana* Mill. Los hongos inoculados fueron *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp. y *Fusarium* sp. Se evaluó su sintomatología en invernadero por dos meses, terminando este tiempo se midió el avance del daño dentro del tallo longitudinal y transversalmente. Se encontró que 'Hass' y 'Méndez No. 1' fueron las variedades más susceptibles a los hongos por el avance de daño interno y la presencia de daño externo, mientras 'Pionero' fue el genotipo menos susceptible. En el resto de los genotipos se encontraron diferencias en cuanto a daño en tejido maduro y tierno.

Palabras clave: *Persea americana* Mill. *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium* sp., enfermedad.¹

General Abstract

PATHOGENICITY OF FUNGI ASSOCIATED WITH AMBROSIAL BEETLES AND SUSCEPTIBILITY IN AVOCADO GENOTYPES

In this study, pathogenicity tests were performed on 'Hass' avocado, of fungi related to ambrosial complexes, where their symptomatology was evaluated, and the progress of damage within the stem, after inoculation of isolates from diseased avocado trees from the state of Michoacán and Chiapas, Mexico. The fungus studied were the following: The fungus studied were the following, *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), *Fusarium solani* and *Fusarium* sp., molecular identification by PCR and sequencing was done with the exception of *R. brunnea* that was previously identified. Emphasizing that *R. brunnea* and *Fusarium* sp., with a greater progress of damage in the stem that in some cases reached the pith tissue, showing wilt on the leaves and reddish-brown stains in the inside of the stem. As a complement to the previous tests, the behavior and susceptibility of the selected fungi were evaluated, which were inoculated into eight varieties ('Hass', 'Pionero', 'Méndez No.1', 'Encinos', 'Maluma', 'Pinkerton', 'HxP 83', 'Fundación II') and a pure race individual ('Olanca 3 S1') of *Persea americana* Mill., to fungi associated with ambrosial complexes from Michoacán and Chiapas, Mexico. The inoculated fungi were *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp., and *Fusarium* sp. Their symptoms were evaluated in the greenhouse for two months, at the end of this time the advance of internal damage inside the stem was measured longitudinally and transversely. 'Hass' and 'Méndez No. 1' were found to be the most susceptible varieties to fungi due to the advance of internal damage and the presence of external damage, while 'Pionero' was the least susceptible genotype. In the rest of the genotypes, differences were found regarding damage to mature and young tissue. The 'HxP 83' genotype showed as an advancement of damage only in the pith tissue, which did not cause external symptoms.

Keywords: *Persea americana* Mill. *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium* sp., disease.

2

1. Introducción General

El aguacate es originario de México y Guatemala, su selección y consumo en México data de hace 10000 años (Barrientos-Priego & López-López, 1998). Este frutal ha sido mundialmente considerado como una gran contribución nutrimental, industrial y comercial. En lo que fue el año 2010 se cultivó al menos en 60 países de los cuáles cabe destacar que México sobresalía como primer productor con 102,467 ha (Gutiérrez-Contreras, Lara-Chávez, Guillen-Andrade & Chávez-Bárcenas, 2010). Estados Unidos es el principal comprador de aguacate mexicano, pues aproximadamente 75 % de sus importaciones provienen de México, seguido por Francia, Japón, Canadá, China, Chile y Australia (Torres, 2009). La producción de aguacate mexicano representa más del 30% de la cosecha mundial, siendo Michoacán el estado de la república que más aguacates produce aportando cuatro quintas partes del total nacional.

El aguacate ha pasado de ser considerada una fruta exótica a incorporarse en la dieta básica en muchos países, incluyéndose en la tendencia creciente hacia el consumo de productos naturales. En el ranking mundial, los principales 20 países productores de aguacate, produjeron 3.5 millones de toneladas (mt). México destaca como el principal productor con 1.2 mt, que representa el 35 % de la producción mundial (SIAP, 2015).

Dentro de las diferentes clases y especies de aguacate, el más consumido en México, y que además está considerado en la canasta básica, es el aguacate 'Hass' por lo que para el 2015 su consumo anual per cápita fue de 6.5 kg (SIAP, 2015). El aguacate mexicano ha adquirido gran importancia, al estimarse que, de cada 10 aguacates comercializados a nivel mundial, tres son vendidos por productores mexicanos.

Recientemente en México ha surgido la preocupación por el monitoreo de lo que se conocen como complejos ambrosiales, que consisten en una relación simbiótica entre un escarabajo y un hongo, donde principalmente las hembras invaden una amplia variedad de especies hospedantes haciendo galerías, en las que se reproducen y cultivan los hongos de los cuales se alimentan tanto las larvas como los adultos. (Eskalen et al., 2013). Estos hongos que son inoculados y cultivados por los escarabajos pueden ser fitopatógenos que causan daños graves en los árboles infectados.

De estos complejos ambrosiales los más estudiados y de interés en México en aguacate han sido el ascomycete *Raffaelea lauricola* que causa una enfermedad vascular en los miembros de la familia de las Lauráceas, llamada Marchitez del Laurel, cuyo principal vector es, *Xyleborus glabratus* (Harrington et al., 2011). Reportado en 2011 en *Persea americana* por primera vez en el condado de Miami, Florida, en Swamp Bay (Ploetz et al., 2011) siendo una amenaza la cercanía de su presencia para las zonas productoras en el norte de México, por otro lado se tiene un gran interés en el hongo *Fusarium euwallacea* y su vector *Euwallacea* sp., (Eskalen et al., 2012); ya que esta asociación provoca la enfermedad conocida como muerte descendente por *Fusarium* o “Fusarium Dieback (FD)” en aguacate y otras lauráceas, es una plaga reglamentada en México, su dispersión representa una amenaza significativa para árboles del paisaje urbano, áreas naturales, marginales y agrícolas. Asimismo, pone en riesgo la producción de 175,939.76 ha de aguacate, con valor de \$20,715,986,370 (SIAP, 2015).

La preocupante cercanía y llegada de estos casos al continente americano ha alertado a las autoridades fitosanitarias de nuestro país ya que estos hongos han causado grandes pérdidas en otros países por lo que el monitoreo y reporte de

nuevos hongos asociados a complejos ambrosiales es de gran importancia para prevenir el daño a los cultivos de aguacate en territorio mexicano.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos generales

Este trabajo busca aportar información acerca de nuevos complejos ambrosiales que se encuentran en los estados de Michoacán y Chiapas. Esto evaluando primeramente la patogenicidad de los hongos asociados a complejos ambrosiales encontrados en estos dos estados mencionados anteriormente en plantas de la var. Hass. Para posteriormente comparar la resistencia de ocho variedades y una raza pura de aguacate inoculados con los hongos seleccionados en las pruebas de patogenicidad.

1.1.2 Objetivos particulares

Identificar mediante técnicas moleculares el hongo proveniente del estado de Chiapas.

Evaluar la patogenicidad de los hongos inoculados.

Identificar la sintomatología y comportamiento de los hongos inoculados.

Comparar la susceptibilidad y daños entre los diferentes genotipos de aguacate seleccionadas.

1.2 Hipótesis

Los hongos evaluados mostrarán diferente sintomatología y daño en los genotipos evaluados, y al menos una variedad mostrará posible resistencia con respecto a los hongos.

2. Revisión de literatura

2.1 Importancia económica

México es considerado el lugar de origen del aguacate (*Persea americana* Mill.) (Sánchez, Mijares, López & Barrientos, 2002) según evidencias en el sitio arqueológico de Coxcatlán, perteneciente a Tehuacán, Puebla. Este fue domesticado y cultivado entre las primeras culturas en Mesoamérica, posteriormente se transmitió de generación en generación por las culturas emergentes (Chen, Morrell, Ashworth, De la Cruz & Clegg., 2009). El aguacate perteneciente a la familia de las lauráceas es una especie polimorfa; árbol de tronco potente con ramificaciones vigorosas, perennifolio con hojas muy brillantes y raíz superficial (Quintero, 2011). Hasta el momento se han descrito tres razas de importancia económica: Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*), Guatemalteca (*Persea americana* var. *guatemalensis*) y Antillano (*Persea americana* var. *americana*) (Galindo et al., 2008). A nivel mundial, México es el principal productor de aguacate concretando en 2012 el 30.19 % de la producción mundial, seguido de Indonesia con 6.75% y de República Dominicana con 6.65 %. (FAOSTAT, 2016).

2.2 Plagas y enfermedades de importancia económica en el aguacate

En el cultivo del aguacate en México se presentan diversas plagas de importancia económica, como los thrips, ácaros y escamas armadas. (Equihua-Martínez, Estrada-Venegas & González-Hernández, 2007). Sin embargo, la Dirección General de Sanidad Vegetal mencionó cerca de 55 plagas asociadas al agrosistema aguacatero; alterando el orden de importancia según el área aguacatera de que se trate.

Los insectos y ácaros que se encuentran asociados al cultivo del aguacate en México varían de región a región dependiendo de las condiciones edafoclimáticas, variedades nativas y mejoradas que se encuentren colindando, difiriendo en los patrones de diversidad. Siendo de gran importancia este cultivo; los investigadores se han centrado en estudiar con más precisión las especies que se asocian al aguacate en las principales zonas productoras de México como lo es Michoacán. Algunas de las principales plagas consideradas son: thrips (Thysanoptera), araña roja (*Oligonychus punicae* H.), barrenadores de tronco y ramas (*Coptorus aguacatae* Kissinger), barrenadores de semilla (*Conotrachelus perseae* y *Conotrachelus aguacatae* Barber (González, et al., 2000). Siendo de mayor importancia fitosanitaria los barrenadores de tronco y ramas y de la semilla del aguacate, por su gran impacto económico que provoca restricciones cuarentenarias.

Entre otro de los factores que limitan la producción y vida del árbol de aguacate se encuentran las enfermedades causadas por bacterias y hongos principalmente, la importancia de estos fitoparásitos varía dependiendo de la región productora y tipo de mercado destino. Entre las enfermedades que destacan por sus daños y prevalencia, es la roña (*Elsinoe perseae*) que infecta los frutos en sus primeros estados fenológicos (Marroquín–Pimentel, 1999; Téliz y Mora, 2007); pudrición del pedúnculo (*Lasiodiplodia theobromae*) provocando la caída de los frutos (Salvador et al., 1999; Téliz y Mora, 2007).

En México por las campañas de restricción por el USD, USA se destacan también la antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*) y roña (*Sphaceloma perseae*) por reducir significativamente la calidad de la fruta destinada a la exportación.) También cabe destacar el daño en raíces que puede causar muerte descendente

del árbol enfermedad conocida como tristeza del aguacate (*Phytophthora cinnamomi*) (Adame, 1993).

2.2.1 Enfermedades canchros

Heladas o daños mecánicos pueden representar el acceso inicial para la entrada de los patógenos que causan canchros que vienen acompañados de exudados, escamas y lesiones que expulsan polvo blanco. (Vitale et al. 2012, Ceja-Torres, Téliz-Ortiz, Osawa-Kawasoe & Morales-García, 2000). En lo que respecta a México, se han reportado varios agentes causales como lo son: *Nectria galligena* (Martínez, 1974; Jiménez, 1987) *Phytophthora boehmeriae* y *Fusarium solani* (Coria, 1985); *Physalospora perseae* (Ramírez y Estrada, 1996). En otros países como Sicilia, Italia se han encontrado hongos asociados al cancro de ramas como *Neofusicoccum parvum*, *Colletotrichium gloesporoides* o *C. frutícola*, *Diaporthe foeniculacea* o *D. sterilis* (Guarnaccia et al, 2016). Cada vez más especies que pertenecen a la familia Nectriaceae son responsables de enfermedades en aguacate, incluyendo muchos miembros de *Fusarium* y géneros similares a este, como *Albonectria* o *Neocosmospora* (Parkinson, Shivas & Dann, 2017, Farr & Rossman 2018).

2.2.2 Escarabajos ambrosiales, hongos simbios y enfermedades asociadas

Los complejos ambrosiales consisten en la relación simbiótica entre un escarabajo y un hongo, estos escarabajos ambrosiales transportan hongos en sus micangios los cuales cultivan al interior de las galerías en la corteza, y se alimentan de este (Rangel, Pérez, Sánchez & Capello, 2012).

Recientemente con la llegada de *Raffaelea lauricola* hongo que causa una enfermedad vascular en miembros de la familia de las Lauraceae llamada como “Marchitez del Laurel” el estudio de los hongos relacionados a escarabajos ambrosiales tomó mayor importancia en el continente americano. Este hongo fitopatógeno y su vector conocido, *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), (Rabaglia, Dole & Cognato, 2006; Hanula, Mayfield, Fraedrich & Rabaglia, 2008; Harrington et al., 2011).

Se asume que su llegada desde Asia a Estados Unidos fue por medio del transporte de su vector en materiales de embalaje (Fraedrich et al., 2008). Posteriormente en lo que fue el año 2011, se reportó en *Persea palustris*, por primera vez en Miami, Florida, en “Swamp Bay”, y poco después en aguacate, *Persea americana* (Ploetz et al., 2011). En poco más de una década, se esparció en varios miembros de la familia lauráceas, en el sudeste de los Estados Unidos, enfermando y afectando tanto poblaciones de árboles autóctonos como cultivares de aguacate (Hughes et al., 2015; Ploetz et al., 2017).

La marchitez del laurel es una seria amenaza para la producción de Florida, al ser la tercera zona productora de aguacate más grande y su propagación podría impactar dramáticamente la producción de otras áreas como lo es California y México (Ploetz et al., 2017). En las escasas pruebas realizadas no se ha encontrado aún un cultivar que sea completamente resistente a la marchitez del laurel, y se sabe que los cultivares de las indias occidentales son los más susceptibles, y aun así los menos susceptibles aún sufren daños graves ante la enfermedad (Ploetz et al., 2012).

La marchitez del laurel afecta el tejido vascular del árbol alterando el flujo de agua y nutrientes causando lo que es considerada una muerte descendente de ramas, esto acompañado de previa sintomatología como lo es marchitez de ramas y decoloración de hojas, rompimientos de ramas con alta producción (Mendel et al., 2014).

Entre otros complejos ambrosiales de interés actual, primeramente, hubo reportes en Israel de los daños provocados en aguacate por el escarabajo *Euwallacea* sp., mejor conocido como “Polyphagus Shot Hole Borer” se han observado en los principales cultivares: 'Hass', 'Pinkerton' y 'Ettinger', pareciendo ser 'Hass' el hospedante más susceptible. Las plantaciones de aguacate en Israel cubren aproximadamente 7,000 ha, y cerca de dos tercios de esta producción total se exporta. Durante un estudio de cinco años, este escarabajo se extendió en aproximadamente el 60 % de la producción en ese país, en donde algunos huertos presentaron tasas de infestación de hasta el 100 % (Eskalen et al., 2012).

Posteriormente en California, EE.UU., se reportó la asociación de *Euwallacea* sp., con *F.euwallaceae Graphium* sp., y *Acremonium* sp en 2012, cuando por primera vez se observó el daño de la muerte descendente por *Fusarium* (Lynch et al., 2016, Eskalen et al., 2012).

Debido a la distribución del complejo ambrosial en California, EE. UU. y su cercanía a México; en el año 2016 se reportó por primera vez al escarabajo *Euwallacea* nr. *forficatus*, capturado en una trampa tipo Lindgreen en la ciudad de Tijuana, en el estado de Baja California, México (García-Ávila et al., 2016); posteriormente, se reportó al Instituto de Ecología (INECOL) en el 2016 la presencia del hongo *Fusarium euwallaceae*, en cuatro árboles en Tijuana, México.

Se sabe que la mayoría de los escarabajos ambrosiales dependen de la relación simbiótica con especies de hongos (Parthiban y Muraleedharan, 1992; Klepzig & Six, 2004) y se debe profundizar en el estudio de hongos relacionados escarabajos ambrosiales.

En lo que respecta a estudios recientes se han hecho acerca de *Xyleborus* en México dirigidos a regiones específicas de México y a hospederos específicos (Atkinson y Equihua-Martínez, 1986) también se ha trabajado en taxonomía y comportamiento de la subfamilia Scolytinae en el país (Romero, Anaya, Equihua & Mejía, 1997; Equihua & Burgos, 2002). Tal como fue en un estudio reciente en Colima donde se registró la presencia de tres especies de escarabajos ambrosiales del género *Xyleborus* en árboles de aguacate (Castrejón-Antonio et al., 2017), este reporte siendo de gran aporte para incentivar el estudio de hongos relacionados a escarabajos ambrosiales en nuestro país.

2.3 Literatura citada

- Adame, E.L. (1993). Plagas del aguacatero y su control. In *Memoria del II Curso de Actualización Técnica para profesionales aspirantes a la acreditación en el manejo fitosanitario del aguacate*. Uruapan: Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo.
- Atkinson, T. H., & Equihua-Martínez, A. (1986). Biology of bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae) of a tropical rain forest in southeastern Mexico with an annotated checklist of species. *Annals of the Entomological Society of America*, 79(3), 414-423.
- Barrientos-Priego, A. F., & López-López, L. (2000). Historia y genética del aguacate. In *El aguacate y su manejo integrado* (pp. 19-31)., Distrito Federal, Mundi-Prensa México.
- Castrejón-Antonio, J. E., Montesinos-Matías, R., Acevedo-Reyes, N., Tamez-Guerra, P., Ayala-Zermeno, M. Á., Berlanga-Padilla, A. M., & Arredondo-Bernal, H. C. (2017). Especies de *Xyleborus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) asociados a huertos de aguacate en Colima, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 33(1), 146-150.
- Chen, H., Morrell, P., L., Ashworth V., E., T., M., De la Cruz, M. & Clegg, M., T. (2009). Tracing the geographic origins of mayor avocado cultivars. *The Journal of Heredity*, 100(1), 56-65.

- Ceja-Torres L. F., Téliz-Ortiz, D., Osawa-Kawasoe, S., & Morales-García, J. L. (2000). Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. en cuatro municipios del estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2), 79-86.
- Coria A., V. M. 1985. Distribución y etiología del cáncer en aguacate *Persea americana* Miller en la región de Uruapan, Michoacán. Tesis profesional. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", UMSNH. Uruapan, Michoacán.
- Equihua M., A., & Burgos, S. A. (2002). Scolytidae. *Biodiversidad, Taxonomía y Biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento*, 3, 539-557.
- Equihua-Martínez, A., Estrada-Venegas, E. G., & González-Hernández, H. (2007). Plagas de aguacate. In *El Aguacate y su Manejo Integrado* (2a. edición, pp. 135-136). México, D.F.: Ed. Mundi-Prensa.
- Eskalen, A. (2013). Host Range of *Fusarium* Dieback and Its Ambrosia Beetle (Coleoptera: Scolytinae) Vector in Southern California. *Plant Disease*, 97, 938-951.
- Eskalen, A., Gonzalez, A., Wang, D. H., Twizeyimana, M., Mayorquin, J. S., & Lynch, S. C. (2012). First report of a *Fusarium* sp. and its vector tea shot hole borer (*Euwallacea fornicatus*) causing Fusarium dieback on avocado in California. *Plant Disease*, 96(7), 1070-1070.
- FAOSTAT. (2016). *Producción/ Cultivos*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. En línea: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>.
- Farr, D. F., & Rossman, A. Y. (2018). *Fungal Databases*, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved February 05, 2018, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>
- Fraedrich, S. W. (2008). California laurel is susceptible to laurel wilt caused by *Raffaelea lauricola*. *Plant Disease*, 92(10), 1469-1469.
- Galindo, T., M. E., Arzate F., A. M., Aguilar, O., Murgía G., J., Lee E., H., & Landero T., I. (2008). *Origen y domesticación de aguacate* (*Persea*

americana Mill), XXI Reunión científica tecnológica forestal y agropecuaria Veracruz y I del trópico mexicano. Veracruz, México.

- García-Ávila, C. D. J., Trujillo-Arriaga, F. J., López-Buenfil, J. A., González-Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L. F., ... & Acevedo-Reyes, N. (2016). First report of *Euwallacea* nr. *forficatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist*, 99(3), 555-556.
- González H., H., Johansen, R., Gasca, C., Equihua, A., Salinas, C., Estrada, E., Durán, F., & Valle, A. (2000). Plagas del aguacate. In D. Téliz (Ed.), *El aguacate y su manejo integrado* (pp. 117-136). Distrito Federal: Ediciones Mundi- Prensa.
- Guarnaccia, V., Vitale, A., Cirvilleri, G., Aiello, D., Susca, A., Epifani, F., ... & Polizzi, G. (2016). Characterization and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 146(4), 963-976.
- Gutiérrez-Contreras, M., Lara-Chávez, M. B. N., Guillen-Andrade E, H., & Chávez-Bárcenas, A. T. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*, 35(9), 647-653.
- Hanula, J. L., Mayfield III, A. E., Fraedrich, S. W., & Rabaglia, R. J. (2008). Biology and host associations of the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), exotic vector of laurel wilt killing redbay (*Persea borbonia*) trees in the Southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 101(4), 1276-1286.
- Harrington, T. C., Yun, H. Y., Lu, S. S., Goto, H., Aghayeva, D. N., & Fraedrich, S. W. (2011). Isolations from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*, confirm that the laurel wilt pathogen, *Raffaelea lauricola*, originated in Asia. *Mycologia*, 103(5), 1028-1036.
- Hughes, M. A., Smith, J. A., Ploetz, R. C., Kendra, P. E., Mayfield, A. E., Hanula, J. L., ... & Carrillo, D. (2015). Recovery plan for laurel wilt on redbay and other forest species caused by *Raffaelea lauricola* and disseminated by *Xyleborus glabratus*. *Plant Health Progress*, 16(4), 173-210.
- Jiménez Rosales, P. (1987). Cáncer de tronco y ramas. In *Memoria del primer curso Fitosanitario y de Nutrición en Aguacate* (pp. 165-172). Uruapan,

Michoacán: Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo

Martínez Barrera, R. (1974). *Compendio de enfermedades del aguacatero en la región de Uruapan, Michoacán y áreas adyacentes* (pp. 10-11). Uruapan, Michoacán: Pfizer. México.

Klepzig, K. D., & Six, D. L. (2004). Bark beetle-fungal symbiosis: context dependency in complex associations. *Symbiosis*, 37, 189-205.

Lynch, S. C., Twizeyimana, M., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Na, F., Kayim, M., ... & Hulcr, J. (2016). Identification, pathogenicity and abundance of *Paracremonium pembeum* sp. nov. and *Graphium euwallaceae* sp. nov.—two newly discovered mycangial associates of the polyphagous shot hole borer (*Euwallacea* sp.) in California. *Mycologia*, 108(2), 313-329.

Marroquín–Pimentel, F.J. (1999). Factores que favorecen la incidencia de roña (*Sphaceloma perseae* Jenk.) en el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.) ‘Hass’ en tres regiones agroclimáticas de Michoacán, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 309–312.

Mendel, Z., Portasov, A., Margalit, O., Sharon, M., Maoz, Y., O'Donnell, K., & Freeman, S. (2014). Tree colonization behavior as a basis for management of *Euwallacea* nr. *forficatus* populations in avocado plantations and ornamentals. Topic: Phylogeny, Phylogeography, Biogeography and Epidemiology. In *Academic and Technical Workshop on Xyleborus glabratus and Euwallacea sp. Simposio Internacional sobre manejo y control de plagas cuarentenarias en el aguacatero* (p. 51). Xalapa, Veracruz: INECOL.

Parkinson, L. E., Shivas, R. G., Dann, E. K. (2017). Pathogenicity of nectriaceous fungi on avocado in Australia. *Phytopathology*, 107, 1479–1485.

Parthiban, M., & Muraleedharan, N. (1992). Symbiotic fungus of the shot-hole borer of tea. *Journal of Plantation Crops*, 20, 75-75.

Ploetz, R. C., Konkol, J. L., Narvaez, T., Duncan, R. E., Saucedo, R. J., Campbell, A., ... & Kendra, P. E. (2017). Presence and prevalence of *Raffaelea lauricola*, cause of laurel wilt, in different species of ambrosia beetle in Florida, USA. *Journal of Economic Entomology*, 110(2), 347-354.

- Ploetz, R. C., Peña, J. E., Smith, J. A., Dreaden, T. J., Crane, J. H., Schubert, T., & Dixon, W. (2011). Laurel Wilt, caused by *Raffaelea lauricola*, is confirmed in Miami-Dade County, center of Florida's commercial avocado production. *Plant Disease*, 95(12), 1589-1589.
- Ploetz, R. C., Pérez-Martínez, J. M., Smith, J. A., Hughes, M., Dreaden, T. J., Inch, S. A., & Fu, Y. (2012). Responses of avocado to laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*. *Plant Pathology*, 61(4), 801-808.
- Quintero, R. S. (2011). El cultivo del aguacate orgánico. Morelia, México: Ediciones Michoacanas.
- Rabaglia, R. J., Dole, S. A., & Cognato, A. I. (2006). Review of American Xyleborina (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) occurring north of Mexico, with an illustrated key. *Annals of the Entomological Society of America*, 99(6), 1034-1056.
- Rangel, R., Pérez, M., Sánchez, S., & Capello, S. (2012). Fluctuación poblacional de *Xyleborus ferrugineus* y *X. affinis* (Coleoptera: Curculionidae) en ecosistemas de Tabasco, México. *Revista de Biología Tropical*, 60(4), 1577-1588.
- Ramírez Villapudua, J., & Estrada Ramírez, F. J. (1996). Cultivo, enfermedades y plagas del aguacatero (221 p.). Culiacán: Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Romero, N. J., Anaya, R. S., Equihua, M. A., & Mejía G. H., (1997). Lista de Scolytidae y Platypodidae de México (Insecta: Coleoptera). *Acta Zoológica Mexicana* 70, 35-53.
- Salvador, L., Miranda, S.P., Aragón, N. & Lara, V. 1999. Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México*, 43,18–23.
- Sánchez C., S., Mijares O., P., López L., L., & Barrientos Priego, A. F. (2002). Historia del aguacate en México. *Memoria de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C., 1998-2001*, 171-187.
- SIAP. 2015. *Cierre de producción agrícola por cultivo*. Ciclo agrícola 2013. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. En línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-l>

- Téliz O., D., & Mora A., G. (2007). El Aguacate y su Manejo Integrado (2da. edición, 320 p.). Distrito Federal: Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. México.
- Torres Preciado, V. H. (2009). La competitividad del aguacate mexicano en el mercado estadounidense. *Revista de Geografía Agrícola*, 43, 61-79.
- Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G., & Polizzi, G. (2012). First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160(3), 156-159.

3. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD DE HONGOS EN PLANTAS DE AGUACATE ‘HASS’ RELACIONADOS A COMPLEJOS AMBROSIALES

Alejandra Barrientos Martínez ¹, Santos Gerardo Leyva Mir¹, Alejandro F. Barrientos-Priego², Mateo Vargas Hernández ¹, Moisés Camacho Tapia ¹

¹Posgrado en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

²Posgrado en Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

3.1 Resumen

Recientemente en México ha surgido la preocupación por el seguimiento de los complejos ambrosiales que consisten en una relación simbiótica entre un escarabajo y un hongo, donde las hembras invaden una amplia variedad de especies haciendo galerías en la corteza y madera, en las que se reproducen y los escarabajos cultivan los hongos para alimentarse, estos hongos pueden ser fitopatógenos causando graves daños en los árboles infectados. La proximidad de *Raffaella lauricola* en Florida y la presencia de *Fusarium euwallacea* en el norte de México; hongos que han causado grandes pérdidas en Estados Unidos ponen en riesgo las zonas productoras de aguacate en México. Por lo que el reporte de nuevos hongos asociados con complejos ambrosiales es de gran importancia. El objetivo del presente estudio fue realizar pruebas de patogenicidad en aguacate ‘Hass’, de hongos relacionados a complejos ambrosiales, donde se evaluó su sintomatología, y el avance del daño dentro del tallo, después de la inoculación de aislamientos provenientes de árboles de aguacate enfermos provenientes del estado de Michoacán y Chiapas, México. Los hongos estudiados fueron los siguientes: *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), *Fusarium solani*, y *Fusarium* sp. Destacó en patogenicidad *R. brunnea* y *Fusarium* sp., con un mayor avance dentro del tallo y daño que en algunos casos llegó hasta el tejido de médula, mostrando marchitez en las hojas y manchado café rojizo en el interior del tallo.

Palabras clave: *Persea americana* Mill. *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium* sp., enfermedad.

3.2 Abstract

Recently there has been concern for the monitoring of ambrosial complexes in Mexico that consist of a symbiotic relationship between a beetle and fungi, where female ones invade a wide variety of species making galleries in the bark and wood, in which beetles reproduce and farm the fungi to feed the colony, these fungi can be a phytopathogen that can cause serious damage in the infected trees. The proximity of *Raffaelea lauricola* to Florida and the presence of *Fusarium euwallacea* in the north of Mexico; fungus that have caused great losses in the United States put in risk the avocado production zones in Mexico. So, the report of new fungi related to ambrosial complexes is of great importance. The objective of the present study was to achieve pathogenicity tests of fungus related to ambrosial complexes on 'Hass' avocado, where their symptomatology was evaluated, and the progress of damage inside the stem, after the inoculation of isolates from diseased avocado trees from the state of Michoacan and Chiapas, Mexico. The fungus studied were the following, *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), *Fusarium solani* and *Fusarium* sp. Emphasizing that *R. brunnea* and *Fusarium* sp., with a greater progress of damage in the stem that in some cases reached the pith tissue, showing wilt on the leaves and reddish brown stains in the inside of the stem.

Keywords: *Persea americana* Mill. *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium* sp., disease.

3.3 Introducción

Nativo de Mesoamérica el aguacate (*Persea americana* Mill.) ha pasado de ser un fruto exótico a uno de los frutos más cotizados comercialmente por su valor nutricional, industrial y comercial en el ámbito mundial. En lo que fue el año 2010, se cultivó en al menos 60 países, entre estos destaca México como principal productor con 102,467 ha y una producción de 1,148,517 toneladas cosechadas (Gutiérrez-Contreras, Lara-Chávez, Guillen-Andrade, & Chávez-Bárcenas, 2002). Actualmente el principal comprador de aguacate mexicano es Estados Unidos, el 75 % de estas exportaciones provienen de México, seguido por Francia, Japón, Canadá, China y Australia (Torres, 2009). Según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, para 2015 la producción de aguacate

en México representaba más del 30 % de la cosecha mundial, destacando en nuestro país como primer estado productor Michoacán contribuyendo con cuatro quintas partes del total de la producción nacional; y para lo que respecta el estado de Chiapas se ubica en el séptimo lugar nacional en la producción de aguacate 'Hass', con una producción anual de casi 17 mil toneladas al año.

El cultivo del aguacate presenta alta producción, a pesar de ser fuertemente afectado por diversas plagas que limitan su comercialización local e internacional, muchas de ellas de importancia cuarentenaria. En la actualidad el seguimiento de complejos ambrosiales ha tomado gran importancia en el país vecino EE. UU., esto a causa de las pérdidas en aguacate generadas principalmente por dos complejos ambrosiales *Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola* y *Euwallacea* sp.-*Fusarium euwallacea*. Estos complejos ambrosiales consisten en una relación simbiótica entre un escarabajo y un hongo, donde las hembras responsables del desarrollo de las colonias invaden una amplia variedad de especies de árboles haciendo galerías en la corteza, donde se reproducen y cultivan distintos tipos de hongos para alimentar a las larvas y adultos, en ocasiones estos hongos pueden ser fitopatógenos y causar graves daños a los árboles invadidos (Eskalen et al., 2013). Por la gran cercanía de la presencia de estos patógenos en territorio estadounidense ha surgido un gran interés en el estudio y monitoreo de estos complejos ambrosiales en México. El ascomycete *R. lauricola* causa una enfermedad vascular en los miembros de la familia de las Lauráceas, llamada Marchitez del Laurel, cuyo principal vector es, *X. glabratus* (Harrington et al., 2011), siendo una amenaza la cercanía de su presencia para las poblaciones naturales de *Lauraceae* y las zonas productoras en el norte de México, ya que la presencia del hongo se ha detectado ya en el estado de Texas, EE. UU. Por otro lado, se tiene un gran interés en el hongo *F. euwallacea* y su vector *Euwallacea* sp. (Eskalen et al., 2013); ya que esta asociación provoca la enfermedad

conocida como “muerte descendente por *Fusarium* en aguacate” y otras lauráceas, primeramente, se encontraba causando estragos en California, EE. UU. y para el año 2016 se reportó por primera vez la presencia del vector *Euwallacea nr. fornicatus* en una trampa en Tijuana, México (García-Ávila et al., 2016).

Estos hongos han causado grandes pérdidas en otros países, por lo que el seguimiento y reporte de nuevos hongos asociados a complejos ambrosiales es de gran importancia para prevenir el daño a los cultivares de aguacate en territorio mexicano. El estudio de estos hongos es escaso en nuestro país por lo que esta investigación buscó aportar conocimiento acerca de la sintomatología y patogenicidad de algunos hongos aislados y asociados con daños por insectos ambrosiales provenientes de Michoacán y Chiapas.

3.4 Materiales y Métodos

Las muestras fueron colectadas en Ario de Rosales, Michoacán y la región de Lázaro Cárdenas del municipio de Trinitaria, Chiapas. Las primeras muestras, que pertenecen al estado de Michoacán, provienen de madera dañada de un árbol de aguacate que sufrió desecamiento donde se identificó al escarabajo *Xyleborus affinis* en Cutzato, de donde se aisló del árbol afectado *Fusarium* sp. También fueron identificados dos escarabajos en madera afectada de aguacate, *Monarthrum conversum* del cual de sus micagias se aisló *Ceratosytiopsis* sp. (identificación inicial), y de *Monarthrum exornatum* de sus micagias se aisló *Raffaelea brunnea* (L.R. Batra) T.C. Harr. (Ángel-Restrepo et al., 2019).

En la región de Lázaro Cárdenas del municipio de Trinitaria, Chiapas, se recolectaron muestras de ramas de aguacate ‘Hass’ afectadas (5 cm de diámetro y 10 cm de largo) fueron colocadas en recipientes plásticos de color oscuro cerrados en tapa hermética como lo describe Carrillo, Duncan, & Peña (2012). El

árbol afectado era parasitado por el escarabajo *Microcorthylus vescus* identificado por el Dr. T. H. Atkinson de la Texas A&M University, y se aisló *Fusarium* sp.

3.4.1 Incremento de hongos

El incremento de hongos se llevó a cabo en medio PDA (papa dextrosa agar) con excepción de *R. brunnea* en el cual se utilizó medio CSMA (cicloheximida, estreptomycin, malta agar y ampicilina) el cual permite el crecimiento de hongos Ophiostomatales (Harrington, 1981). Posteriormente, se seleccionó una colonia representativa y se realizó un cultivo monospórico para la identificación molecular de cada hongo no reconocido y para la inoculación de las pruebas de patogenicidad.

3.4.2 Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en 28 plantas de aguacate de un año y medio, injertadas con el cv. Hass sobre portainjertos de la raza mexicana y con una altura alrededor de 1.20 m, las cuales se inocularon y mantuvieron bajo condiciones de invernadero en Chapingo, Texcoco, Estado de México. Se realizaron cuatro repeticiones por cada hongo a inocular; una planta por repetición. La inoculación se realizó en dos puntos de crecimiento, en la base cercana al injerto (maduro) y en un brote (joven), se realizó un corte con navaja estéril de 5 mm en el tallo, se colocó un disco micelial de 0.5 cm de diámetro de PDA o CSMA con micelio acorde a cada uno de los hongos a inocular, posteriormente se cubrió con una sola capa de parafilm. A las plantas testigo se les produjeron heridas iguales, se les asperjó agua estéril. Posteriormente se metieron a cámara húmeda 72 horas manteniendo una HR mayor o igual al 80 % para la penetración exitosa del hongo. Se realizaron evaluaciones cada semana durante 1 mes para ver el desarrollo de la enfermedad, presencia y ausencia de

alguna sintomatología. Al finalizar este tiempo se realizó una evaluación destructiva en la cual se realizaron cortes longitudinales en el tallo para cuantificar el avance de la infección en el xilema y determinar si estuvo presente el daño en otros tejidos. Para lo cual se midió la longitud que avanzó la infección hacia arriba y hacia abajo del punto de inoculación.

3.4.3 Re-aislamiento del patógeno

Tras las pruebas de patogenicidad se seleccionaron los hongos que mostraron mayor daño y avance en los tejidos de las plantas de aguacate, se realizaron re-aislamientos y se purificaron las colonias. Para lo cual, se retiró parte de la corteza de la muestra obtenida, se cortaron fragmentos de 5 mm en dónde se encontraba el tejido dañado, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 3 % durante 90 segundos; se enjuagaron tres a cuatro veces con agua estéril; se secaron en papel estéril y se sembraron en cajas Petri. Los fragmentos se sembraron en medio de cultivo PDA y CSMA, dependiendo del hongo, y se colocaron a 25 °C por 7 días. Posteriormente se seleccionaron las colonias más características de hongos y se procedió a purificarlos por lo que las colonias se transfirieron a cultivo agua-agar y se incubaron a 25 °C por 3 días. Obteniendo aislados monospóricos por punta de hifa transfiriéndose nuevamente a medio PDA o CSMA, según el caso.

3.4.4 Identificación molecular de los hongos fitopatógenos

A partir de estas colonias que se dejaron de 7 a 14 días de crecimiento en PDA y CSMA se extrajo micelio aéreo con espátula, con la excepción de *Raffaelea brunnea* la cual estaba perfectamente identificada, posteriormente se maceró en un mortero de porcelana estéril al cual se le adicionó nitrógeno líquido gradualmente. Posteriormente se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml con 500 µL de buffer de extracción (Meyerowitz), se expuso a 45 °C durante

30 minutos mezclando por inversión cada 5 minutos. Se agregaron 30 μ L de CTAB al 10 % y 70 μ L de cloruro de sodio a 5 M y se colocó a 65 °C por 30 min. Se añadieron 50 μ L de acetato de potasio 5 M y se incubó a -20 °C por 5 minutos, al término de la incubación se mezcló con 700 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min, temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL y se le agregaron 640 μ L de isopropanol frío para precipitar el ADN. Durante 10 min se incubó la muestra a -20 °C y después se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, temperatura ambiente para obtener el botón. El sobrenadante se desechó y se añadieron 500 μ L de etanol al 70 % para lavar el pellet a 13,000 rpm durante 5 min. El etanol se descartó, posteriormente se secaron los botones durante 20 min a temperatura ambiente. Se agregaron 40 μ L de agua destilada libre de ADNasa para rehidratar el ADN.

Se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región completa del espacio transcrito interno (ITS4). La PCR se llevó a cabo en un termociclador BIORAD® (EE. UU.), con una desnaturalización inicial de 94 °C 2 min, 35 ciclos de 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en agarosa al 1 %. El gel se analizó en un transiluminador GelDoc-It™ 300 UVP (Inglaterra). Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (Corea) estas secuencias fueron editadas y ensambladas con el programa Geneious® 9.1.5 (<https://www.geneious.com>) (Kearse et al., 2012). Las secuencias resultantes fueron alineadas y comparadas en homología (99-100 %) con secuencias de la base de datos del banco de genes (NCBI GenBank) utilizando el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Se realizó para la muestra perteneciente a Chiapas una alineación de secuencias con muscle v3.8.31, posteriormente se

buscó el modelo que mejor se ajustó a los datos acorde a MEGA 7 el cual fue el modelo de sustitución nucleotídica: Kimura de dos parámetros. Después se realizó una filogenia con el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas de remuestreo (“bootstrap”).

3.5 Resultados

Se realizó una alineación de secuencias para la muestra perteneciente a *Fusarium* sp. del Estado de Michoacán, la cual en Blast mostró una mayor similitud de la secuencia sometida del 50 % con un valor de error de 0 y un porcentaje de identidad similar del 93.12 % a la muestra con el identificador KF880404.1 perteneciente a *Fusarium solani*.

Se realizó una alineación de secuencias para la muestra perteneciente a *Ceratocystiopsis* sp. la cual en BLAST mostró una mayor similitud de la secuencia sometida del 48 % con un valor de error de 0 y un porcentaje de identidad similar del 96.93 % a la muestra con el identificador JF946760.1 perteneciente a *Ophiostoma* sp, cabe mencionar que la mayor parte de las secuencias sugeridas con Megablast predominaban en su mayoría por *Ophiostoma* sp.

También se realizó una alineación de secuencias para la muestra perteneciente al estado de Chiapas, la cual en BLAST mostró una mayor similitud con una secuencia sometida del 23 % con un valor de error de $2e-17$ y un porcentaje de identidad similar del 93.70 % a la muestra con el identificador MK595413.1 perteneciente a *Fusarium solani*, otras de las secuencias sugeridas con megablast son *Fusarium oxysporum*, *Neonectria* sp., *Fusarium* sp. (FSSC) y *Necosmospora* sp. Dado la relativa baja similitud se procedió a realizar la construcción de una filogenia (Figura 1), la cual se basó en el DNA (ITS), el árbol se generó a partir de especies del género *Fusarium*, y otros miembros de la

familia Nectricaceae según la publicación Lombard et al (2015) y de la familia Tilachlidiaceae. El análisis filogenético se realizó con el modelo de sustitución Kimura de dos parámetros con el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas de remuestreo (“bootstrap”). En dicho árbol se pudo observar una distinción clara con las otras especies de *Fusarium* y cuya ramificación tiene 100 % de certeza, por lo que es probable que se trate de una nueva especie (Fig 1).

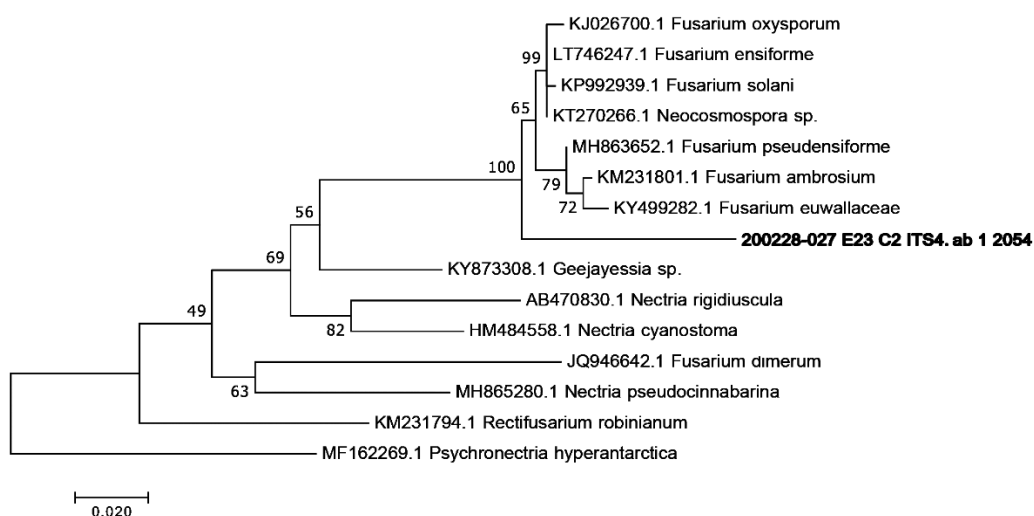


Figura 1 Árbol del mejor modelo Kimura-2P x ML de la alineación de la secuencia (ITS) del hongo proveniente de Chiapas asociado al barrenador ambrosial *Microcorthylus vescus*. La barra de escala muestra 0.02 sustituciones por sitio, los valores de “Bootstrap” de 1000 réplicas se muestran al lado de las ramas. La muestra del aislado corresponde al nombre de C2 (en letras negritas).

Los hongos originarios de Michoacán fueron agrupados por su morfología, en el caso de *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), fueron separados en cinco colonias diferentes con características similares ya que la morfología del crecimiento variaba en forma y color. *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), fue separado en cinco colonias a las cuales se les asignó el siguiente nombre para diferenciarlas Ce1, Ce2, Ce3, Ce4 y Ce5. Por otro lado, en el caso de *Fusarium solani* y *Raffaelea brunnea* solo se consideró una misma colonia ya que la

morfología que se mostró en varias de las cajas fue recurrente, sin encontrar alguna diferencia de color o forma de crecimiento. En el caso de Chiapas sólo se logró conservar una colonia de hongo perteneciente a *Fusarium* sp., la cual mostró únicamente un tipo de colonia.

En las pruebas realizadas en las distintas colonias de *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp) se pudo observar lo siguiente; Ce1 mostró una inoculación exitosa tras las 72 horas de mantenerse en cámara húmeda ya que a los escasos 5 días de ser inoculado apareció un poco de polvo granuloso blanco en la zona de la herida, Ce2 mostró una inoculación exitosa tras las 72 horas de mantenerse en cámara húmeda ya que a los 5 días de ser inoculado apareció polvo granuloso ligeramente amarillento en la zona de la herida, y a los siete días se observó que los pequeños brotes comenzaban a marchitarse.

En una de las plantas se inició a ver como surgía alrededor de la herida de inoculación un halo necrótico de 1 cm, en cada extremo acompañada con marchitez en sus hojas de un color café muy pálido, se prosiguió a abrir el tallo afectado para observar el daño y se pudo observar cómo los tejidos por dentro, ya se encontraban secos en un color café claro sin tensión hídrica, extendiéndose completamente a toda una rama que se secó por completo. Al décimo día otra planta comenzó a presentar defoliación y la presencia de polvo ligeramente amarillento aún se tenía presente, misma planta que al día 20 se encontraba aún más defoliada pero no completamente.

Ce4 mostró una inoculación exitosa tras las 72 horas de mantenerse en cámara húmeda, a los 5 días de ser inoculado mostró polvo amarillento granuloso en la zona de la herida, y posteriormente a los 20 días presentan marchitez en las puntas de las hojas.

En el caso de Ce3 y Ce5 mostraron una inoculación exitosa tras las 72 horas de mantenerse en cámara húmeda, aunque no hubo una sintomatología externa significativa más que la presencia de polvo blanquecino, pero en menor cantidad que en los otros casos desde el 5 día y marchitez muy ligera en una planta de Ce5 a partir del día 20.

Se realizaron re-aislamientos de estas colonias y se obtuvieron 100 % en el caso de Ce1 y Ce2, 75 % en el caso de C3 y un 50 % en el caso de Ce4 y Ce5.

Fusarium solani, mostró a los 5 días de ser inoculado polvo granuloso blanco y en partes amarillentas. Al séptimo día se pudo observar que el polvo empezó a extenderse a lo largo de los tallos de una manera más extensa, se pudo apreciar que presentó secreciones de azúcares por parte de la planta, por lo mismo, ésto pudo haber logrado que el hongo se extendiera en la parte externa del tallo en mayor longitud y proporción que los demás, como se muestra en la (Figura 2-1b). El re-aislamiento de *Fusarium* fue del 80 %.

Raffaelea brunnea, mostró una inoculación exitosa al tercer día y se pudo observar que ya había indicios de polvo granuloso blanco, el cual al quinto día era mucho mayor su crecimiento en la zona de la herida, desarrollándose en la superficie de la herida en forma de domo (Figura 2-3b), al décimo día se pudo empezar a observar una cicatrización negra parecida a una necrosis, aunque se podía ver un poco de polvillo color negro (Figura 2-3b). A los 15 días algunas de las plantas presentaban marchitez en el ápice de las hojas, el cual fue avanzando hacia el interior de las mismas, como se muestra en la (Figura 3-3a). El re-aislamiento fue de 60 %, su desarrollo en medio CSMA fue de 1 a 2 semanas.

Fusarium sp., mostró una inoculación exitosa tras las 72 horas de mantenerse en cámara húmeda ya que a los escasos 5 días de ser inoculado apareció un poco de polvo granuloso blanco al igual que exudados de azúcares. A los 7 días

empezó a mostrar una sintomatología peculiar en las hojas, marchitez desde el ápice avanzando en el margen de éstas. Para el día 20 algunas hojas mostraban una marchitez más pronunciada de un color café claro que en algunos casos tendía a un tono violáceo, llegando hasta un tercio de la hoja (Figura. 3-2a), y la herida de inoculación mostraba aún polvo blanco (Figura 2-2b). El re-aislamiento fue de 90 %.

En cuanto a las mediciones del avance longitudinal del daño de los hongos en lo que fueron las inoculaciones en brote maduro, cabe destacar que *R. brunnea* presentó diferencias significativas con *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce1 y *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce3 (Figura 4) y fue el que tuvo más avance con un promedio de 23.47 mm, seguido por Ce1 con 13.05 mm y *Fusarium* sp., con 12.24 mm. Seguidos, respectivamente, por *Fusarium*, Ce5, Ce2, Ce4 y Ce3. Por estas características en el avance en brote maduro de los tres primeros, estos podrían causar más daño en plantas de una edad más avanzada. Los daños encontrados en la corteza mostraron, por otra parte, coloraciones color café rojizo que van marcando el avance distintivo tras los cortes longitudinales del tallo (Figura 3).

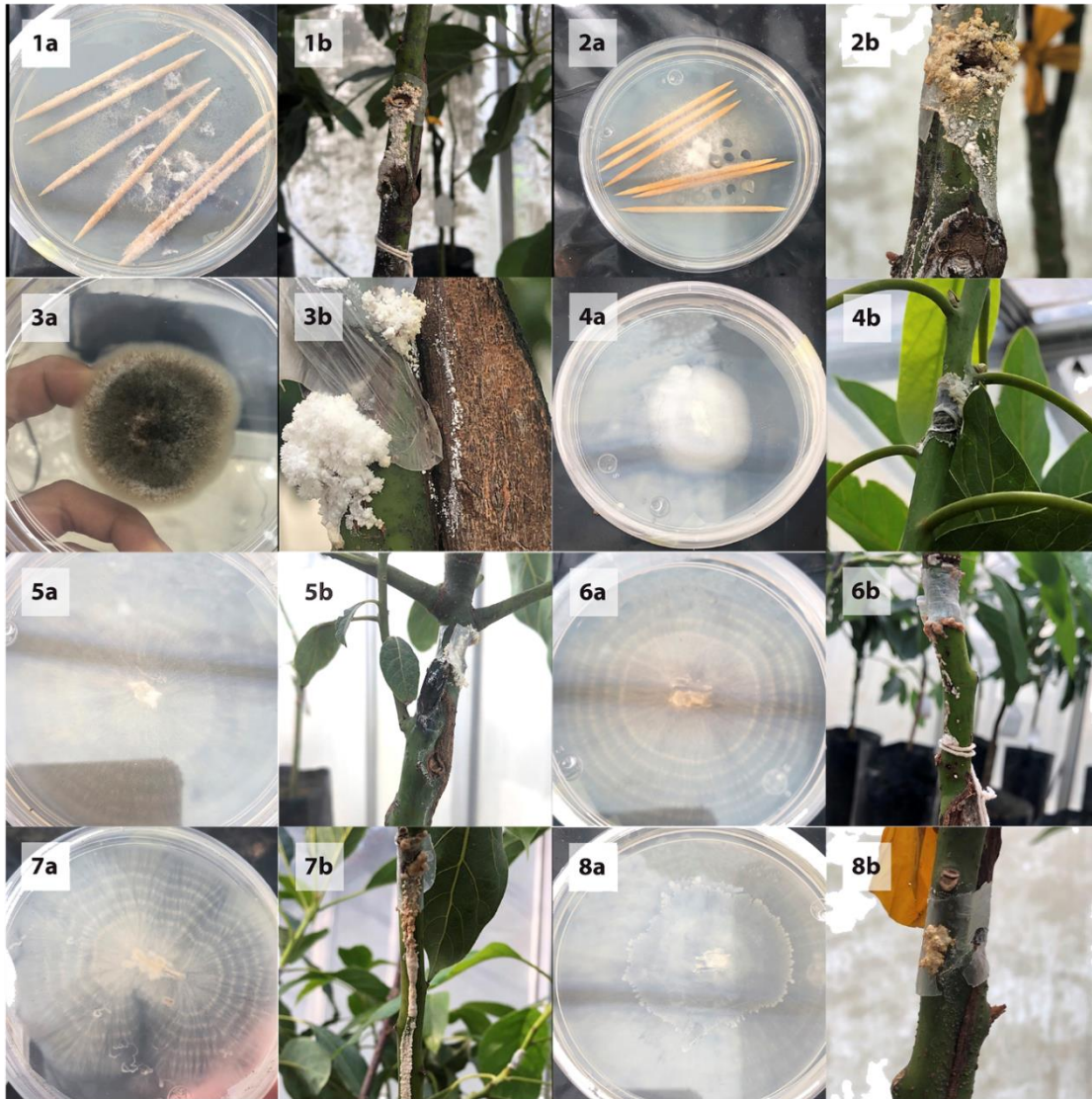


Figura 2 Colonias de hongos y sintomatología en invernadero. 1) *Fusarium solani*, 2) *Fusarium* sp., 3) *Raffaelea brunnea*, 4) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce1, 5) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce2, 6) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce3, 7) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce4, 8) *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce5. Las imágenes son referentes a) Colonia en PDA, excepto *R. brunnea* en CSMA, a los 7 días a temperatura ambiente y b) Herida a los 15 días de inoculación



Figura 3 Cortes longitudinales de var. Hass. Cortes longitudinales de var. Hass. 1 *Fusarium solani*, 2 *Fusarium* sp., 3 *Raffaelea brunnea*, 4 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce1, 5 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce2, 6 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce3, 7 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce4, 8 *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce5. Las imágenes son referentes a) Sintomatología en hojas a los 30 días y b) cortes longitudinales del tallo mostrando el avance del daño de la enfermedad a los 30 días.

Respecto al análisis de comparación de medias (Figura 5) del avance del daño en brote tierno se observó diferencia significativa de *Fusarium* sp. con *Ophiostoma* sp. Ce3, siendo mayor el avance en *Fusarium* sp. con 14.93 mm, *Ophiostoma* sp. Ce1 con 13.09 mm, *Ophiostoma* sp. Ce2 con 12.63 mm, y *Fusarium solani*, con 11.03 mm. Seguidos por *R. brunnea*, *Ophiostoma* sp. Ce4, *Ophiostoma* sp. Ce5 y *Ophiostoma* sp. Ce3. El avance en brote tierno puede hacer suponer que plantas más jóvenes podrían ser más susceptibles a estos patógenos y la parte de las ramas más jóvenes o la parte superior del tallo. La coloración de un café rojizo es la que distintivamente marca el avance de la enfermedad tanto para arriba como para abajo de las heridas de inoculación (Figura 3).

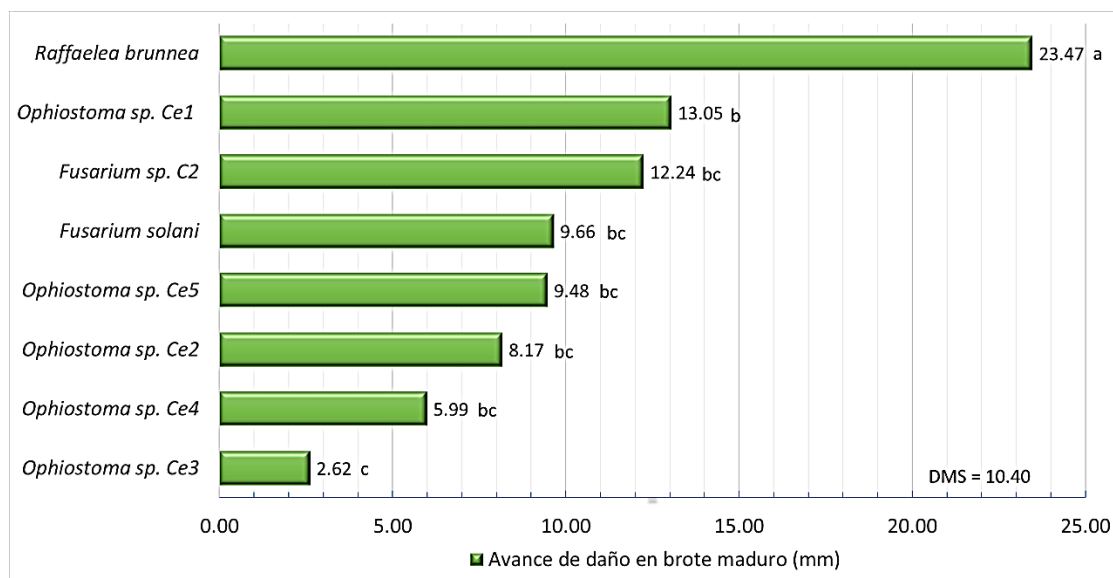


Figura 4 Avance del daño longitudinal por hongos asociados a barrenadores ambrosiales en brote maduro de aguacate 'Hass'. Letras distintas significan diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (DMS) a una $P=0.05$.

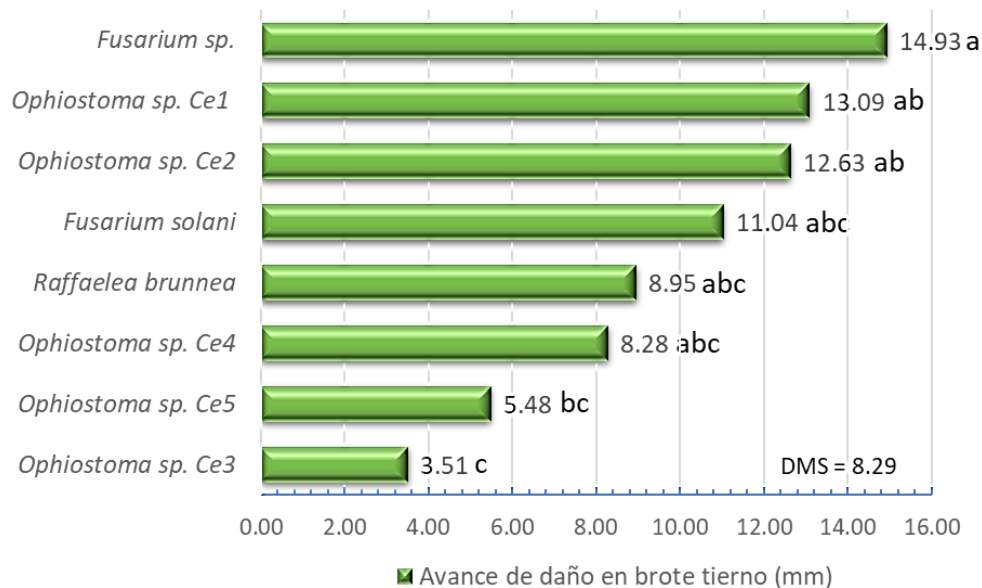


Figura 5. Avance del daño longitudinal por hongos asociados a barrenadores ambrosiales en brote tierno de aguacate 'Hass'. Letras distintas significan diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher a una $P=0.05$.

En cuanto al avance del daño dentro del tallo, donde se vieron involucrados otros tejidos como lo fue no sólo el xilema y floema, sino transversal hasta llegar a la médula (Figura 3). *Fusarium sp.*, y *R. brunnea*. mostraron un mayor avance con 2.05 mm y 2.03 mm, respectivamente (Figura 6), seguido por Ce4, Ce2 y *Fusarium solani*, a los tejidos internos del tallo tanto para brote tierno como brote maduro, mostrando una coloración café rojiza similar a la del avance que fue longitudinal. En el caso de Ce1, Ce3 y Ce5 ninguno de los casos mostró daños que llegaron a la médula, sin embargo, cabe mencionar que la separación de medias no mostró diferencias estadísticas significativas.

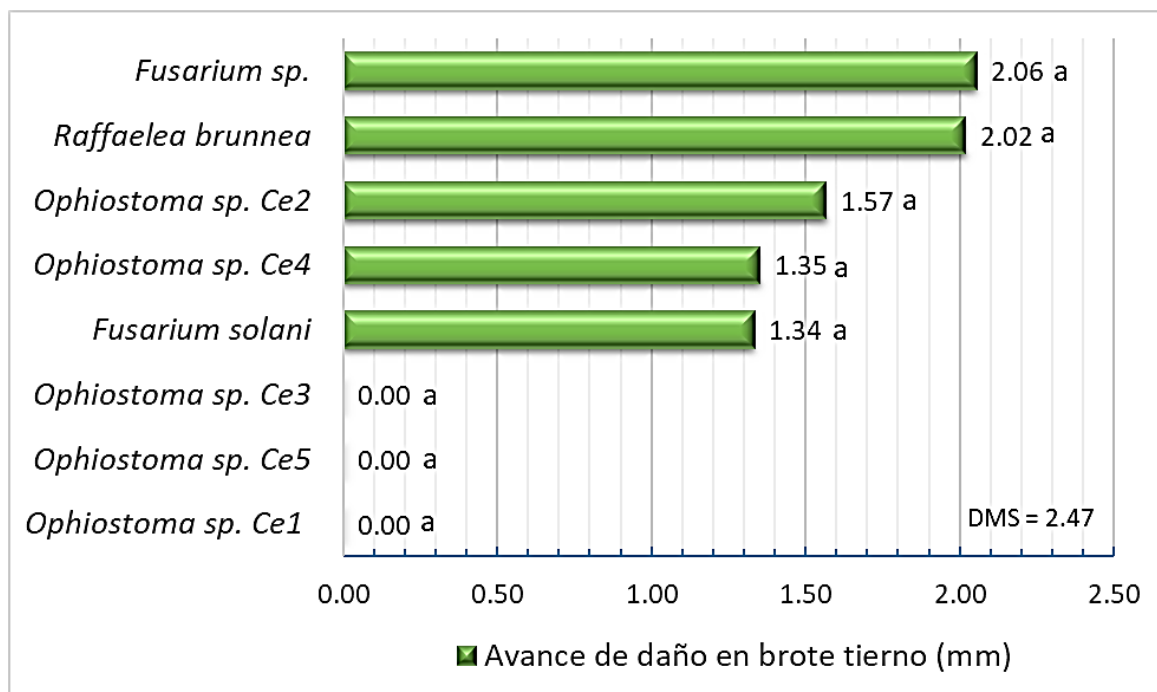


Figura 6. Avance transversal el daño de los hongos dentro del tallo de aguacate 'Hass'. Letras distintas significan diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher LSD (DMS) a una $P=0.05$.

En cuanto a lo que respecta al promedio del avance total de daño en brote tierno, brote maduro y dentro del tallo se observó que destacan *R. brunnea*, *Fusarium sp.* y *Ophiostoma sp. Ce1* (Figura 7), como los hongos que presentaron mayor avance de daño por lo que se puede considerar que deben de ser los más agresivos o dañinos en el tiempo que se realizó la evaluación, siendo común entre ellos que la sintomatología externa no forzosamente indicará la severidad del daño interno encontrado. También cabe mencionar que no necesariamente el daño debe llegar a la médula para presentar sintomatología, ya que muy probablemente el daño en xilema y floema es primordial en la presencia de los síntomas.

Por otro lado, las otras colonias evaluadas de *Ophiostoma* sp. (Ce2, Ce3, Ce4 y Ce5) y *Fusarium solani*. aunque causaron daño, el avance fue menor a los anteriores, pudiéndose considerar menos agresivos.

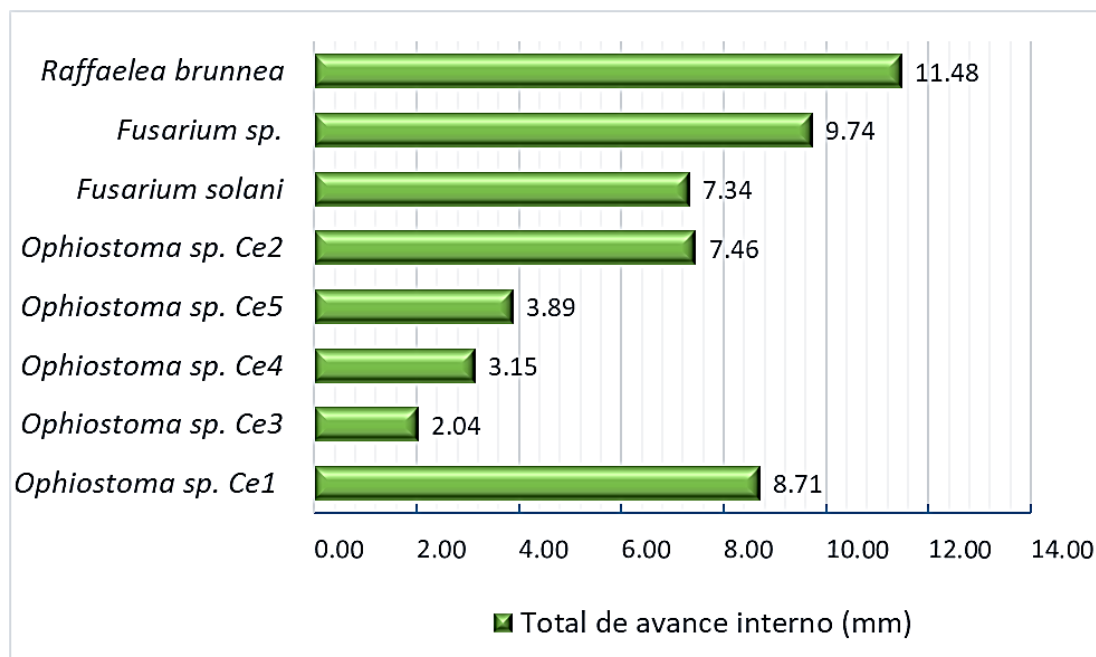


Figura 7. Avance promedio total del daño interno de los tipos de brote y los tipos de daño de los hongos en aguacate 'Hass'.

3.6 Discusión

En el caso de los resultados obtenidos en Blast con relación a *Ophiostoma* sp. se puede contemplar también que entre el género *Ceratocystiopsis* y *Ophiostoma* se encuentran muy pocas diferencias llegándose a sugerir una sinonimia entre los dos géneros, como argumenta Wingfield (1993) que mencionó que no es lógico mantener a *Ceratocystiopsis* como un género diferente basado en que *Ophiostoma* contenga como distinción morfológica múltiples formas de ascosporas, siendo esta divergencia solo una de muchas características para hacer subdivisiones en el género. Por lo que posteriormente se sugiere el realizar

una sinonimia entre estos dos géneros, una identificación morfológica más a fondo ya que la principal diferencia reside en que *Ophiostoma* tiene una gran variedad de ascosporas con distinta morfología (Hausner, Reid & Klassen, 1993) y se procedió formalmente a reducir a *Ceratocystiopsis* como una sinonimia de *Ophiostoma*, basado en secuencias SSU y LSU rDNA.

Respecto a *Fusarium* sp. (C2) de Chiapas se pudo observar que es parte del clado correspondiente a los géneros *Fusarium* y *Neocosmospora*, posteriormente formándose dos subclados donde se puede ver que el aislado C2 diverge de las especies de *Fusarium* presentes en la filogenia. Lo anterior puede indicar que nuestro C2 puede ser una nueva especie, formar parte de algún clado en el cual alguna especie en común no fue contemplada en la filogenia o se debió realizar una alineación de secuencias con el DNA de otro loci, por lo que se sugiere realizar más estudios para obtener una información más precisa. Cabe mencionar que las especies pertenecientes a *Nectriaceae* son conocidos por ser responsables de enfermedades en plantas de aguacate (Vitale et al., 2012, Parkinson et al., 2017), e incluyen dentro de ella varios miembros del género *Fusarium* y similares a este, como *Neocosmospora* (Farr & Rossman 2018).

En lo que respecta a *Ophiostoma* sp. la cepa Ce1 destacó con un avance sobresaliente en los brotes tiernos y maduros, pero no se mostraron daños que llegaran hasta la médula a diferencia de otra de las dos colonias C3 y C4 que mostraron daño en médula, pero avance de la enfermedad en brote tierno y maduro no significativa. Generalmente los hongos pertenecientes al género *Ceratocystiopsis* (*Ophiostoma*) causa daños en pinos, lo cual fue reportado en Inglaterra (Winfield & Gibbs, 1991), se mencionó también que puede llegar a causar manchado de la madera (Zhou, De Beer, Wingfield & Wingfield, 2001) tal como se pudo observar en los tallos donde el manchado marca el avance del daño causado por el hongo en ambos tipos de brotes en xilema y floema. La

información respecto de este hongo es bastante reducida por lo que los aportes nuevos acerca de esto es de gran importancia, y más en aguacate.

En cuanto a lo que se observó, *Fusarium solani*, mostró a los 5 días de ser inoculado polvo granuloso blanco y en partes amarillento similar a lo que menciona Ceja, Téliz, Osada, & Morales (2000) en el caso de *Fusarium oxysporum* y *F. solani* donde la inoculación artificial en el tallo de plántulas de aguacate mostró una necrosis tenue con polvo granuloso blanco, e indicaron que también ese síntoma externo coincide con lo que llegaron a observar en campo. También a diferencia de *F. oxysporum* y *F. solani* donde se mencionó que estos únicamente provocaron pequeñas lesiones de color rojizo bajo la corteza que no se extendieron ni profundizaron hacia el cilindro central, en este estudio la cepa de *Fusarium solani*, se pudo observar como si existió daño en floema, xilema, y en algunos casos hasta la médula. Como se mencionó previamente al séptimo día se pudieron observar exudados de azúcares provenientes de las lesiones de inoculación acompañadas de polvo blanco que se regaba a lo largo de esta secreción, similar al caso de árboles parasitados por *Fusarium euwallacea*, donde se ha mencionado que los aguacates infestados exhiben depósitos de polvo blanco y exudados compuestos de perseitol alrededor de la herida de entrada del barrenador (Mendel et al., 2012). Aunque se pudo observar un manchado en la corteza y una sintomatología característica, *Fusarium solani* no resultó ser de los más patogénicos, sin embargo, se considera que una evaluación en árboles mayores y un experimento de mayor duración puede generar diferentes resultados.

En lo que se refiere a *R. brunnea* se mencionó que a los 15 días algunas de las plantas presentaban marchitez café en la punta de las hojas, al paso de los días la marchitez fue avanzando hasta cubrir casi toda el área foliar. *R. brunnea* presentó el mayor avance longitudinal en el tallo de brote maduro y tierno, tuvo

daños en la corteza que llegaron hasta la médula en algunos casos, demostrando que es capaz de llegar a otros tejidos. Los daños observados en los cortes fueron rayas y parches de color café rojizo. Relacionando la sintomatología externa e interna se pudo observar que no era necesario que la planta tuviera un daño interno para forzosamente presentar una sintomatología externa. Lo previamente escrito es similar a lo mencionado por Ploetz et al. (2012) en *R. lauricola* donde se realizaron pruebas de patogenicidad en variedades de aguacate, señalando que los primeros síntomas foliares de la marchitez del laurel, es marchitez en las hojas cambiando de un color de un verde olivo a un café tan pronto que se marchiten, la coloración de los daños se mostró en un color café oscuro en parches o rayas como sintomatología externa y un color café rojizo de manera interna contrastando con la corteza. También se pudo observar que la sintomatología interna y externa estaba relacionada, pero en algunos casos donde había una severidad vascular mayor se desarrollaba una sintomatología externa menor. Con esto se puede indicar que el comportamiento ente *R. brunnea* y *R. lauricola* es similar en cuánto a sintomatología externa e interna, y sobre todo, que la relación entre ellas no necesariamente pareciera estar ligada de manera estricta, donde en el caso de haber daño interno puede o no presentarse síntomas externos, pero no presentarse una sintomatología sin un daño interno. Lo cual puede ser debido a la resistencia que pone la planta ante la enfermedad, y sobrepasando esa resistencia es cuando los síntomas externos comienzan a presentarse y así dar paso también a muertes súbitas e inesperadas, siendo esto último lo más peligroso para el productor, ya que la enfermedad y la severidad de la enfermedad podría pasar en ocasiones desapercibida. Cabe indicar que de acuerdo con el árbol filogenético de *Raffaelea sensu stricto* el cual se divide en dos, *Raffaelea brunnea* y *Raffaelea lauricola* están en la misma rama, o sea más relacionadas (Dreaden et al., 2014).

En lo que respecta al hongo perteneciente a Chiapas, *Fusarium* sp., se encontró polvo blanquecino emanado del punto de inoculación y en las heridas dentro del tallo color café rojizo similar a lo encontrado por Guarnaccia, Sandoval-Denis, Aiello, Polizzi & Crous (2008) en Sicilia, Italia, donde encontraron lesiones en la corteza de aguacate similar a un cancro, con exudados de azúcares en la superficie y por dentro del tallo un color café rojizo, esto en el nuevo hongo que proponen *Neocosmospora perseae*. En lo que respecta a las evaluaciones realizadas con *Fusarium* sp., fue el segundo en tener más avance en el tallo y daño, el cual llegó hasta la médula deteriorando varios tejidos. Esto último puede explicar la sintomatología de marchitez que se encontró aproximadamente desde los 7 días y que fue avanzando gradualmente. En campo, en árboles adultos de aguacate este hongo afecta ramas jóvenes de uno a dos años y avanza regresivamente e inclusive llegando al tronco y eventualmente secando todo el árbol.

Por otra parte, se debe de tomar en cuenta que los estudios solo se realizaron en una variedad de aguacate, por lo que esto puede ser un factor importante, ya que probablemente si se probaran los hongos en más variedades se podría encontrar más diferencias en el comportamiento del avance de los hongos. También cabe recalcar que el estudio se realizó bajo condiciones de invernadero, donde las plantas y hongos no se expusieron a los cambios ambientales ni interacciones con otros organismos, lo cual pudo influir significativamente en los resultados.

Para obtener resultados más certeros se sugiere el uso de árboles con una edad mayor y más repeticiones para obtener resultados con una mayor sensibilidad. Un experimento en campo sería lo más adecuado, donde se pudiese evaluar el daño generado por la constante interacción de los escarabajos con los hongos. Una evaluación con mayor duración podría proporcionar más datos, ya que el

avance de los hongos a mayor tiempo puede producir mayores daños y sintomatología diferente. Por otra parte, el comportamiento que pudiesen tener los hongos con otras variedades de aguacate es de gran importancia, ya que no han sido estudiados en México, y en otros países.

La búsqueda de más fitopatógenos asociados con escarabajos ambrosiales en todo el país, relacionado con el cultivo del aguacate debe ser priorizada, ya que se desconoce la interacción que pueda tener con el cultivo de interés y se sabe que varias pueden provocar pérdidas económicas considerables, generando así un conocimiento preventivo para el manejo fitosanitario y del cultivo, identificando plagas potenciales para el aguacate en este país.

3.7 Conclusiones

Raffaelea brunnea., *Fusarium* sp., *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), y *Fusarium solani*, son considerados patogénicos por el avance del daño en tallo, en brote maduro y brote tierno.

En cuanto a *R. brunnea* se encontró un comportamiento peculiar, en la relación entre la severidad del daño interno y externo, en el cual se describe que en el caso de haber daño interno puede o no presentarse síntomas externos, estrictamente en plantas de aguacate 'Hass' a los 30 días de inoculados.

3.8 Agradecimientos

Se agradece al Dr. Salvador Ochoa Ascencio de la Facultad de la Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo por las cepas de hongos provenientes de Michoacán. Al Dr. Erik Acuayte Valdes y al M. C. José Roberto Bermúdez Barrientos por su apoyo en la investigación.

3.9 Literatura Citada

- Ángel-Restrepo, M., Ochoa-Ascencio, S., Fernández-Pavía, S., Vázquez-Marrufo, G., Equihua-Martínez, A., Barrientos-Priego, A. F., Correa-Suarez, M., & Saucedo-Carabez, J. R. (2019). Identificación de escarabajos ambrosiales (Coleópteros: Curculionidae) asociados a árboles de aguacate en Michoacán, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 5(2), 80-88.
- Carrillo D., Duncan R., & Peña J.E. (2012) Ambrosia beetles (Curculionidae: Scolytinae) that breed in avocado wood in Florida. *Florida Entomology*, 95, 573–579. <https://doi.org/10.1653/024.095.0306>.
- Ceja Torres, L. F., Téliz Ortiz, D., Osada Kawasoe, S., & Morales García, J. L. (2000). Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. En cuatro municipios del estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2), 79-86.
- Dreaden, T. J., Davis, J. M., De Beer, Z. W., Ploetz, R. C., Soltis, P. S., Wingfield, M. J., & Smith, J. A. (2014). Phylogeny of ambrosia beetle symbionts in the genus *Raffaelea*. *Fungal Biology*, 118(12), 970-978.
- Eskalen, A., Stouthamer, R., Lynch, S. C., Rugman-Jones, P. F., Twizeyimana, M., Gonzalez, A., & Thibault, T. (2013). Host range of *Fusarium* dieback and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytinae) vector in southern California. *Plant Disease*, 97(7), 938-951.
- Farr, D. F., & Rossman A.Y. (2018). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved February 05, 2018, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>.
- García-Avila, C. D. J., Trujillo-Arriaga, F. J., López-Buenfil, J. A., González-Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L. F., ... & Acevedo-Reyes, N. (2016). First report of *Euwallacea* nr. *forficatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist*, 99(3), 555-556.
- Guarnaccia, V., Sandoval-Denis, M., Aiello, D., Polizzi, G., & Crous, P. W. (2018). *Neocosmospora perseae* sp. nov., causing trunk cankers on avocado in Italy. *Fungal Systematics and Evolution*, 1(1), 131-140.

- Gutiérrez-Contreras, M., Lara-Chávez, M. B. N., Guillen-Andrade E, H., & Chávez-Bárcenas, A. T. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*, 35(9), 647-653.
- Harrington, T. C. (1981). Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia*, 73,1123–1129. <https://doi.org/10.2307/3759682>
- Harrington, T. C., Yun, H. Y., Lu, S. S., Goto, H., Aghayeva, D. N., & Fraedrich, S. W. (2011). Isolations from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*, confirm that the laurel wilt pathogen, *Raffaelea lauricola*, originated in Asia. *Mycologia*, 103(5), 1028-1036.
- Hausner, G., Reid, J., & Klassen, G. R. (1993). *Ceratocystiopsis*: a reappraisal based on molecular criteria. *Mycological Research*, 97(5), 625-633.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Lombard, L., Van der Merwe, N. A., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, 80, 189-245.
- Mendel, Z., Protasov, A., Sharon, M., Zveibil, A., Yehuda, S. B., O'Donnell, K., ... & Freeman, S. (2012). An Asian ambrosia beetle *Euwallacea fornicatus* and its novel symbiotic fungus *Fusarium* sp. pose a serious threat to the Israeli avocado industry. *Phytoparasitica*, 40(3), 235-238. doi:10.1007/s12600-012-0223-7
- Torres Preciado, V. H. (2009). La competitividad del aguacate mexicano en el mercado estadounidense. *Revista de Geografía Agrícola*, 43, 61-79.
- Parkinson, L. E., Shivas, R. G., & Dann, E. K. (2017). Pathogenicity of nectriaceous fungi on avocado in Australia. *Phytopathology*, 107, 1479–1485
- Ploetz, R. C., Pérez-Martínez, J. M., Smith, J. A., Hughes, M., Dreaden, T. J., Inch, S. A., & Fu, Y. (2012). Responses of avocado to laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*. *Plant Pathology*, 61(4), 801-808.

- Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G., & Polizzi, G. (2012). First report of root rot caused by *Ilyonectria* (=Neonectria) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160(3), 156–159.
- Wingfield, M. J. (1993). *Problems in delineating the genus Ceratocystiopsis* (pp. 21-26). American Phytopathological Society.
- Wingfield, M. J., & Gibbs, J. N. (1991). *Leptographium* and *Graphium* species associated with pine infesting bark beetles in England. *Mycological Research*, 95(11), 1257-1260.
- Zhou, X., De Beer, Z., Wingfield, B., & Wingfield, M. (2001). Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia*, 53, 290-300.

4. Susceptibilidad de variedades de aguacate a hongos asociados con complejos ambrosiales

Alejandra Barrientos Martínez ¹, Santos Gerardo Leyva Mir¹, Alejandro F. Barrientos-Priego², Mateo Vargas Hernández ¹, Moisés Camacho Tapia³

4.1 Resumen

La evaluación de germoplasma de aguacate con la llegada de importantes complejos ambrosiales al continente americano que generan grandes pérdidas económicas ha resultado de gran importancia, esto con la finalidad de aportar conocimiento al posible manejo de variedades resistentes. Por lo cual el objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento y susceptibilidad de ocho variedades ('Hass', 'Pionero', 'Méndez No.1', 'Encinos', 'Maluma', 'Pinkerton', 'HxP 83', 'Fundación II') y una raza pura ('Olanca 3 S1') de *Persea americana* Mill. a hongos asociados a complejos ambrosiales provenientes de Michoacán y Chiapas, México. Los hongos inoculados fueron *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp. y *Fusarium* sp. Se evaluó su sintomatología en invernadero por dos meses, terminando este tiempo se midió el avance del daño interno del tallo longitudinal y transversalmente. Se encontró que 'Hass' y 'Méndez No. 1' fueron las variedades más susceptibles a los hongos por el avance de daño interno y la presencia de daño externo, mientras 'Pionero' fue el genotipo menos susceptible. En el resto de los genotipos se encontraron diferencias en cuanto a daño en tejido maduro y tierno. El genotipo 'HxP 83' presentó como particularidad avance de daño solo en el tejido de médula lo que no causó sintomatología externa.

Palabras clave: *Persea americana* Mill., *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp., *Fusarium* sp., enfermedad.

Susceptibility of avocado varieties to fungi associated with ambrosial complexes

4.2 Abstract

The evaluation of avocado germplasm with the arrival of important ambrosial complexes in the American continent that generate great economic losses has been of great importance, to contribute with knowledge to the possible management of resistant varieties. Therefore, the objective of the present study

was to evaluate the behavior and susceptibility of eight varieties ('Hass', 'Pionero', 'Méndez No.1', 'Encinos', 'Maluma', 'Pinkerton', 'HxP 83', 'Fundación II') and a pure race individual ('Olanca 3 S1') of *Persea americana* Mill., to fungi associated with ambrosial complexes from Michoacan and Chiapas, Mexico. The inoculated fungi were *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp., and *Fusarium* sp. Their symptoms were evaluated in the greenhouse for two months, at the end of this time the advance of internal damage inside the stem was measured longitudinally and transversely. 'Hass' and 'Méndez No. 1' were found to be the most susceptible varieties to fungi due to the advance of internal damage and the presence of external damage, while 'Pionero' was the least susceptible genotype. In the rest of the genotypes, differences were found regarding damage to mature and young tissue. The 'HxP 83' genotype showed as an advancement of damage only in the pith tissue, which did not cause external symptoms.

Keywords: *Persea americana* Mill., *Raffaellea brunnea*, *Ophiostoma* sp., *Fusarium* sp., disease.

4.3 Introducción

La llegada de complejos ambrosiales al continente americano y las pérdidas causadas por estos en la industria del aguacate ha sido preocupante para los productores del mismo. De origen asiático, el escarabajo *Xyleborus glabratus*, llegó al continente en 2002 y, en 2008 se encontró relacionado simbióticamente con un nuevo hongo, *Raffaelea lauricola*, al cual se le adjudicó la enfermedad de marchitez del laurel. El cual se extendió rápidamente por el sudeste de Estados Unidos en varios miembros de la familia de las Lauráceas, terminando por afectar la principal zona productora de aguacate de Florida (Fraedrich, 2008; Harrington et al., 2011; Hughes et al., 2015). Por otra parte, tras las pérdidas causadas en California, en el año 2016 se reporta por primera vez al escarabajo *Euwallacea* nr. *forficatus*, capturado en una trampa en la ciudad de Tijuana, en el estado de Baja California, México (García-Ávila et al., 2016); posteriormente, el INECOL (Instituto de Ecología A. C. de México) en ese mismo año reportó la presencia

del hongo *Fusarium euwallaceae*, en cuatro árboles en Tijuana, México (Equihua et al., 2016).

En México existen escarabajos ambrosiales locales que pueden encontrarse atacando árboles de aguacate (Ángel-Restrepo et al., 2019) y que dispersan hongos asociados, estos insectos pueden en el futuro, ser transmisores de *Fusarium euwallaceae* y de *Raffaelea lauricola* por transferencia lateral o “contaminación cruzada” de los hongos (Gebhardt, Begerow & Oberwinkler, 2004), como ha pasado ya en EE. UU., aparte de los posibles hongos patogénicos que puedan contener

Por lo que es de importancia realizar un escrutinio entre genotipos, respecto a hongos patogénicos asociados a escarabajos ambrosiales con el fin de crear conocimiento que se pueda aportar con respecto al posible manejo de variedades resistentes, lo cual podría auxiliar para implementar estrategias de manejo integrado. Este estudio buscó evaluar el comportamiento de hongos asociados a complejos ambrosiales provenientes de Michoacán y Chiapas, previamente seleccionados en pruebas de patogenicidad y comparar la susceptibilidad de ocho variedades y una raza pura de aguacate inoculados con *Raffaelea brunnea*, *Ophiostoma* sp. y *Fusarium* sp.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Hongos

Los hongos seleccionados para el experimento fueron usados previamente en otra investigación donde se realizaron pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate del cv. Hass, eligiendo así los hongos que mostraron un mayor avance de daño en el interior del tallo. Estos hongos provinieron de Ario de

Rosales, Michoacán (*R. brunnea* y *Ophiostoma* sp.) y de la región de Lázaro Cárdenas del municipio de Trinitaria, Chiapas (*Fusarium* sp.). Respecto a los escarabajos asociados a esos hongos, los primeros se recolectaron de dos insectos en madera afectada de aguacate *Monarthrum conversum* del cual de sus micangias se aisló *Ophiostoma* sp., y al igual en *Monarthrum exornatum* se obtuvo *R. brunnea* (L.R. Batra) T.C. Harr. (Ángel-Restrepo et al., 2019). En la región de Lázaro Cárdenas del municipio de Trinitaria, Chiapas, se recolectaron muestras de ramas de aguacate 'Hass' afectada (5 cm de diámetro y 10 cm de largo) las cuales fueron colocadas en recipientes plásticos de color oscuro cerrados con tapa hermética como lo describió Carrillo, Duncan & Peña (2012). El árbol afectado era parasitado por el escarabajo *Microcorthylus vesus* identificado por el Dr. T. H. Atkinson de la Texas A&M University, y se aisló el hongo *Fusarium* sp.

4.3.2 Incremento de hongos

El incremento de hongos se llevó acabo en medio PDA (papa dextrosa agar) para *Fusarium* sp. y para *R. brunnea* y *Ophiostoma* sp se utilizó medio CSMA (cicloheximida, estreptomicina, malta agar y ampicilina) el cual permite el crecimiento de hongos Ophiostomatales (Harrington, 1981). Posteriormente, se seleccionó una colonia representativa y se realizó un cultivo monospórico, para la inoculación de las pruebas de patogenicidad.

4.3.3 Genotipos de aguacate

Se consideraron ocho variedades de aguacate y una raza pura pertenecientes a la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. que alberga el Banco Nacional de Germoplasma del Aguacate y Universidad Autónoma Chapingo. Las variedades fueron seleccionadas por su potencial comercial, las cuales fueron:

'Hass', 'Pionero', 'Méndez No.1', 'Encinos', 'Maluma', 'Pinkerton', 'HxP 83', 'Fundación II' y 'Olanca 3 S1' (CH-G-11 S1) de la raza guatemalteca (Cuadro 1).

Cuadro 1. Genotipos de aguacate inoculados con hongos asociados a escarabajos ambrosiales

Genotipo	Variedad botánica o raza	Origen	Se obtuvo de:	Característica
'Hass'	M × G	EE. UU.	Universidad Autónoma Chapingo	Estándar internacional
'Méndez No. 1' ['Hass Carmen']	M × G	México	Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.	Variedad mutante de 'Hass' con producción fuera de época normal, actualmente segunda variedad cultivada en México
'Maluma' ['Dries Hass']	G × M	Sudáfrica	Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.	Variedad nueva que tiene varias perspectivas a nivel mundial
'Pionero'	M × G	México	Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.	Nueva variedad con buena producción y calidad
'Pinkerton'	G × M	USA	Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.	Variedad con muy buena producción y porte bajo
'Encinos'	G × M	México	Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.	Variedad con perspectivas para uso para cortina rompevientos y polinizador
'Fundación II'	M × G	México	Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.	Variedad con perspectivas para la industria del guacamole, planta enana y muy productiva
'HxP 83'	M × G ('Pionero' × 'Hass')	México	Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.	Nueva variedad con buena producción y calidad
'Olanca 3 S1'	G	Chiapas, México	Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C.	Genotipo puro de la raza guatemalteca

4.4.4 Evaluación de genotipos

El experimento se realizó en un total de 104 plantas de aguacate de un año de edad, injertados con los genotipos antes indicados sobre portainjertos de la raza mexicana y con una altura alrededor de 1 m, los cuales se inocularon y mantuvieron bajo condiciones de invernadero en Chapingo, Texcoco, Estado de México. Se realizaron cuatro repeticiones por cada hongo (excepto en 'Olanca 3 S1' y 'Pionero' con tres repeticiones), por lo que el diseño experimental fue desbalanceado; una planta por repetición. La inoculación se realizó en dos puntos de crecimiento, en la base cercana al injerto (maduro) y en un brote (joven), se realizó un corte con navaja estéril de 5 mm en el tallo, se colocó un disco micelial de 0.5 cm de diámetro de PDA o CSMA con micelio, acorde a cada uno de los hongos a inocular. Posteriormente la herida se cubrió con una sola capa de parafilm. A las plantas testigo se les produjeron heridas iguales, se les asperjó agua estéril. Posteriormente se metieron a cámara húmeda 72 horas manteniendo una humedad relativa mayor o igual al 80 % para propiciar un adecuado ambiente para el hongo. Se realizaron evaluaciones cada semana durante 2 meses para ver el desarrollo de la enfermedad, presencia y ausencia de alguna sintomatología externa. Al finalizar este tiempo se realizó una evaluación destructiva en la cual se realizaron cortes longitudinales en el tallo para cuantificar el avance de la infección y determinar los tejidos dañados. Para lo cual con un Vernier digital se midió la longitud que avanzó la infección hacia arriba y hacia abajo del punto de inoculación, por otra parte, en algunas plantas también se realizó una medición trasversal cuando presentaban un daño hacia la médula.

4.4.5 Reaislamiento del patógeno

Tras evaluar y medir el avance de los daños, se realizaron reaislamientos, y se purificaron las colonias. Para lo cual, se retiró parte de la corteza de la muestra obtenida, se cortaron fragmentos de 5 mm en dónde se encontraba el tejido dañado, se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 3 % durante 90 segundos; se enjuagaron tres a cuatro veces con agua estéril; se secaron en papel estéril y se sembraron en cajas Petri. Los fragmentos se establecieron en medio de cultivo PDA y CSMA, dependiendo del hongo, y se colocaron a 25 °C por 7 días.

4.4.6 Diseño Experimental y de tratamientos

Se utilizó un diseño completamente al azar. Como factores de estudio se consideraron los tres hongos y los nueve genotipos de plantas de aguacate, por lo que el diseño de tratamientos fue factorial 3 x 9, y dio un total de 27 tratamientos que contienen las combinaciones de ambos factores. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS.

4.5 Resultados

4.5.1 Observaciones externas de síntomas

En lo que respecta a los síntomas externos se encontraron varias combinaciones en hongo-genotipo, donde se visualizó que existieron más síntomas de *Ophistoma* sp. y *Fusarium* sp. en los diferentes genotipos (Cuadro 2), mientras que 'HxP 83' y 'Pionero' presentaron menos síntomas en todos los hongos inoculados a lo largo de los 60 días de evaluación.

Cuadro 2. Síntomas externos presentados en plantas de genotipos de aguacate después de inoculación de hongos asociados a escarabajos ambrosiales.

Hongo inoculado y genotipo	Síntomas después de los días de inoculación									
	0	7	14	21	28	35	42	49	56	60
<i>Raffaelea brunnea</i>										
‘Fundación II’	S	MP								
‘HxP 83’	S	MP								
‘Pinkerton’	S	MP	D	NR						
‘Hass’	S	MP								
‘Olanca 3 S1’	S	MP								
‘Encinos’	S	MP NR								
‘Méendez No. 1’	S	MP				HC	HC	D	MD	
‘Pionero’	S	MP								
‘Maluma’	S	MP NR	MD	HC	D	NR				
<i>Ophiostoma</i> sp.										
‘Fundación II’	S	MP						HC	HC	HC
‘HxP 83’	S	MP	E							
‘Pinkerton’	S	MP D	MD	HC	D	MD				
‘Hass’	S	MP	E					HC	HC	HC
‘Olanca 3 S1’	S	MP						D	D	D
‘Encinos’	S	MP	HC	D	NR			D	D	D
‘Méendez No. 1’	S	MP	NR							
‘Pionero’	S	MP								
‘Maluma’	S	MP	HC	D	NR	HC	D	NR		
<i>Fusarium</i> sp.										
‘Fundación II’	S	MP EN	D	NR	D					
‘HxP 83’	S	MP								
‘Pinkerton’	S	MP	D	NR						
‘Hass’	S	MP	D	NR		NR	D	D	D	D
‘Olanca 3 S1’	S	MP				NR HC	HC	D	D	D
‘Encinos’	S	MP EN	P	P	P	NR	D	D	D	D
‘Méendez No. 1’	S	MP								
‘Pionero’	S	MP								
‘Maluma’	S	MP NR	MD							

S: Saludable, E: Exudados del tallo, EN: Exudado naranja, HC: Hojas cafés, D: Defoliación, MP: Micelio polvo, P: Pudrición, NR: Necrosis en ramas, MR: Muerte descendente.

Raffaelea brunnea después de ser inoculada y de utilizar la cámara húmeda para asegurar la penetración del hongo, al día 5 las plantas presentaron crecimiento micelar alrededor de la herida con polvo granuloso blanquecino, al día 7 una planta de 'Maluma' y otra de 'Encinos' mostraron daño en ramas con una coloración café oscura indicando una necrosis que avanzó de manera descendente. A los 14 días la planta de 'Maluma' que presentaba necrosis en ramas sufrió de muerte descendente y una planta de 'Pinkerton' comenzó a presentar defoliación, a los 21 días, otra de 'Pinkerton' presentó necrosis en las ramas con una coloración café y otra planta de 'Maluma' empezó a presentar una coloración café en las hojas. A los 28 días la planta de 'Maluma' con hojas de color café presentó defoliación y una planta de 'Méndez No. 1' comenzó a presentar hojas con coloración café.



Figura 8 Sintomatología externa en aguacate. 'Hass, 2) 'Méndez No.1', 3) 'Pionero', 4) 'HxP 83' de los hongos a) *Ophiostoma* sp., b) *Fusarium* sp., c) *Raffaelea brunnea* asociados a escarabajos ambrosiales.

4.5.2 Observaciones de daños internos

En lo que respecta a la sintomatología interna en *R. brunnea* cabe destacar que en el caso de la variedad 'HxP 83' se encontró que esta solamente presentaba un manchado en la médula, sin daño en xilema y floema con una coloración que iba desde lo grisáceo a un color café claro. 'Pionero' presentó una coloración grisácea tenue en médula y ligeramente café en floema, ambas variedades no mostraron sintomatología externa (Figura 9), en el caso de 'Maluma', 'Pinkerton', 'Encinos' y 'Méndez No. 1' (Figura 9) en la mayoría de las repeticiones se encontraron daños presentes en lo que fue xilema, floema y en algunos casos hasta llegar a la médula de coloración café rojiza.

La sintomatología interna encontrada en las variedades inoculadas con *Ophiostoma* sp. mostraron daños que se extendieron en xilema y floema y a veces llegando a la médula en 'Encinos', 'Méndez No.1', 'Maluma', 'Pinkerton' y 'Hass' (Figura 9). En 'Olanca 3 S1' predominó la presencia de daño en médula, aunque en ocasiones llegó a afectar otros tejidos, en cuanto a 'Fundación II' y 'HxP 83' el daño se limitó únicamente a la médula, mientras en 'Pionero' no se encontró daño contundente en ningún tejido, el avance fue casi nulo. La coloración del daño fue desde café claro, café rojizo, café oscuro.

Referente a la sintomatología interna encontrada en las variedades que fueron inoculadas con *Fusarium* sp. todas las variedades mostraron daño interno y daño en xilema y floema, en algunos casos llegando a la médula con una coloración café rojiza, sin embargo, en lo que respecta al daño encontrado en 'HxP 83' este únicamente se limitó a la médula y en 'Pionero' el daño presentado en xilema y floema fue casi nulo (Figura 9).



Figura 9 Daños internos en variedades de aguacate 1) 'Hass, 2) 'Méndez No.1', 3) 'Pionero', 4) 'HxP 83' de los hongos a) *Ophiostoma* sp., b) *Fusarium* sp., c) *Raffaelea brunnea*, d) *Raffaelea brunnea*, corte longitudinal completo donde se muestra que el avance del daño interno se limita solamente al tejido de la médula en 'HxP 83'. Los hongos son asociados a escarabajos ambrosiales.

4.5.3 Análisis de varianza

Se realizó un análisis de varianza considerando la estructura factorial del experimento, es decir para los efectos principales de hongos y de variedades y la interacción entre ellos. Se encontró que el factor hongo fue altamente significativo ($P \leq 0.01$) en lo que respecta al daño que se midió de manera longitudinal en tallo maduro, mientras que para daño longitudinal en tallo tierno y transversal no presentó diferencias (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza de hongos asociados a escarabajos ambrosiales inoculados en genotipos de aguacate.

Factor	Probabilidad y significancia		
	Daño longitudinal en tallo maduro	Daño longitudinal en tallo tierno	Daño transversal en tallo
Hongo	0.0007 **	0.7923 NS	0.0848 NS
Genotipo	0.3437 NS	0.0043 **	0.0029 **
Hongo x Genotipo	0.0803 NS	0.0053 **	0.1699 NS

**Significativo a una $P \leq 0.01$. NS: No significativo

El factor variedades presentó al contrario del factor hongo, diferencias significativas ($P \leq 0.01$) para avance del daño transversal y longitudinal en tallo tierno. Mientras que no fue significativo para avance longitudinal de daño en tallo maduro.

En lo que respecta a la interacción Hongo x Genotipo, solo se encontró significativo el avance longitudinal de daño en brote tierno. Para avance longitudinal en tallo maduro y transversal no fue significativa.

4.5.4 Factor hongo

Se encontró que los tres hongos presentaron diferencias entre medias respecto a avance de daño longitudinal en tallo maduro, donde *Raffaelea brunnea* fue diferente a *Ophiostoma* sp. y *Fusarium* sp. (Cuadro 4). Para avance del daño longitudinal y transversal no presentaron diferencias (Cuadro 4).

Cuadro 4. Avance de daños internos en los tallos de aguacate por hongos asociados a escarabajos ambrosiales.

Factor	Probabilidad y significancia		
	Daño longitudinal en tallo maduro	Daño longitudinal en tallo tierno	Daño transversal en tallo
<i>Raffaelea brunnea</i>	17.00 a ^z	13.14 a	1.11 b
<i>Ophiostoma</i> sp.	11.22 b	13.01 a	2.33 a
<i>Fusarium</i> sp.	10.86 b	14.60 a	1.48 ab
DMS	3.41	5.13	1.09

^zMedias con letras diferentes por columnas son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Fisher LSD a una $P=0.05$. DMS: diferencia mínima significativa.

4.5.5 Factor genotipo de aguacate

Respecto a los genotipos de aguacate evaluados ‘Hass’ resultó el más dañado por el avance longitudinal de los hongos en tallo maduro, sin embargo, no existieron diferencias con varios de los otros genotipos (Figura 10), pero si con ‘Maluma’, ‘Pionero’ y ‘Olanca 3 S1’ que presentaron menor avance de daño.

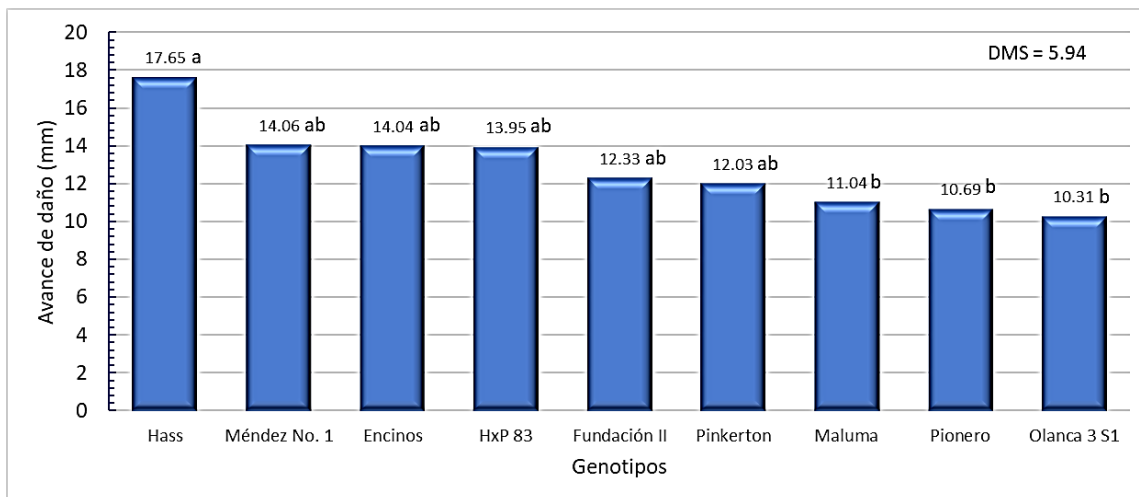


Figura 10. Avance de daño longitudinal en tallo maduro en genotipos de aguacate inoculados con hongos asociados a escarabajos ambrosiales. Medias con letra diferente indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Fisher LSD a una $P=0.01$. DMS: Diferencia Mínima Significativa

En cuanto a las medias del avance del daño longitudinal en brote tierno se observó que los hongos recorrieron más en 'Hass' siendo diferente ($P \leq 0.01$) a cuatro genotipos que presentaron menor avance y se consideró como la más susceptible (Figura 11), mientras que el menos fue 'Pionero'. 'Fundación II' también destacó al ser menos susceptible comparado con 'Hass'. 'Méndez No. 1' fue la segunda más susceptible y el resto de los genotipos tuvo diferente grado de avance del daño.

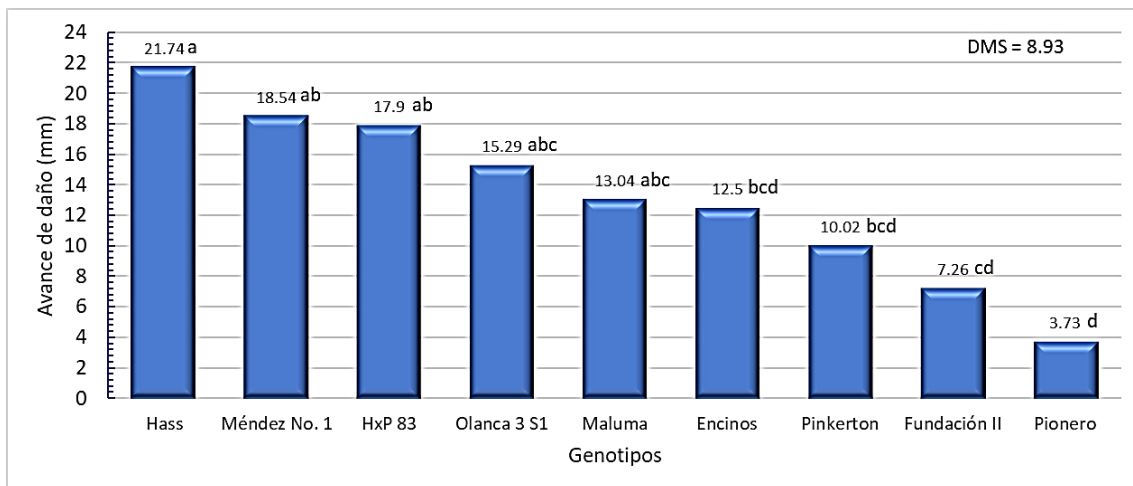


Figura 11. Avance de daño longitudinal en tallo tierno en genotipos de aguacate inoculados con hongos asociados a escarabajos ambrosiales. Medias con letra diferente indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Fisher LSD a una $P=0.01$. DMS:Diferencia Mínima Significativa.

En el avance del daño transversal el mayor valor fue para 'Hass' y seguido de 'Méndez No. 1' (Figura 12). Por otra parte, 'Fundación II' y 'Pionero' fueron los menos susceptibles a este tipo de daño.

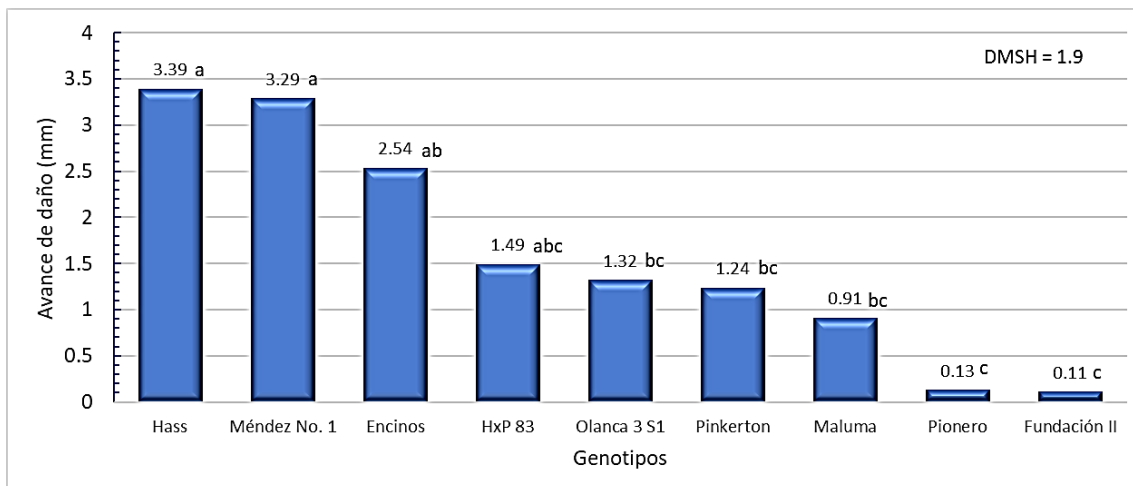


Figura 12. Avance de daño transversal en tallos de genotipos de aguacate inoculados con hongos asociados a escarabajos ambrosiales. Medias con letra diferente indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba de Fisher LSD a una $P=0.01$. DMS: Diferencia Mínima Significativa.

4.6 Discusión

De acuerdo con la sintomatología externa, para *R. brunnea* se observó que los genotipos ‘Maluma’, ‘Encinos’, ‘Pinkerton’ y ‘Méndez No. 1’ presentaron una forma más tardía de esta, donde el factor común fue una muerte o necrosis en ramas de forma descendente, al igual que defoliación, hojas tornándose color café, y solo en algunos casos muerte descendente. Dicha sintomatología encontrada es similar a la de la marchitez del laurel provocada por *R. lauricola* en aguacate y otras lauráceas, donde se presentaba marchitez foliar y ésta a su vez se atribuía a cambios físicos e histológicos (Inch & Ploetz, 2011; Beckman, 1964). Cabe recalcar que se pudo observar un comportamiento con un patrón inconsistente entre los daños externos donde en ocasiones solo algunas ramas presentaban muerte del tejido, acompañada de defoliación, al igual se encontró que a pesar de no estar presentes los síntomas externamente

(Cuadro 2) o en ciertos tejidos de la planta, mostraban un daño interno notorio como se observa en la (Figura 9), también se pudo observar una muerte rápida e inesperada a falta de sintomatología expresada exteriormente. Esto concuerda con lo observado por (Ploetz et al., 2012), que indicaron inconsistencias entre la sintomatología y el desarrollo sistémico de la enfermedad, en el que el árbol muere.

En lo que respecta a la sintomatología interna cabe destacar que en el caso de 'HxP 83' se encontró que solamente presentaba un manchado en la médula, la cual recorrió el xilema y se registró como avance longitudinal (Figura 9), sin daño en xilema y floema, y el caso de 'Pionero' presentó daño en médula y floema, ambos genotipos no mostraron sintomatología externa (Figura 8), en el caso de 'Maluma', 'Pinkerton', 'Encinos' y 'Méndez No. 1' (Figura 9) en la mayoría de las repeticiones se encontraron daños presentes en xilema, floema y en algunos casos hasta llegar a la médula, y donde sí se presentaron síntomas externos. Tanto xilema y floema son sistemas de conducción con funciones específicas en las plantas (Raven, 1983), por lo que un daño a las mismas, causa desabasto de agua vía xilema y es probable que los daños en la parte aérea empezando por las hojas se notan síntomas parecidos a la de sequía.

El efecto evaluado del avance longitudinal del daño en tallo maduro señaló que los tipos de hongos son significativos, esto pudo deberse a los diferentes niveles de enzimas de penetración de los respectivos hongos, ya que estos juegan un papel significativo en la patogénesis al ser capaces o no de degradar la cutina y suberina (Kolattukudy, 1985), que son esenciales para su avance.

En el caso de avance longitudinal de daño en brote tierno en el cual el factor genotipo puede atribuirse a los rasgos propios de cada uno, hay evidencias de que existen diferencias en contenido de sustancias antifúngicas dieno entre individuos de aguacate, las cuales se han encontrado en hojas (Carman & Handley, 1999) y que seguramente se transportan vía floema a otras partes del árbol. Inclusive se ha encontrado que hay diferencias en contenido de dienos antifúngicos por efecto del portainjerto sobre el injerto de 'Hass' donde hay más concentración en las hojas (Willingham et al., 2001). Al igual se encontró un efecto significativo entre la interacción hongo × genotipo, esto puede ser atribuido a que la composición de la pared celular es considerada un elemento clave en las interacciones planta-patógeno pudiendo ser una barrera de la entrada del patógeno y puede verse implicada en las respuestas inmunológicas del hospedero (Götesson et al., 2002), donde la lignina es de gran importancia para la composición de la pared celular y que puede ser favorecida por algunos cofactores para su formación como es el manganeso (Burnell, 1988) y cuyo contenido se sabe que puede variar dependiendo del genotipo e inclusive por el uso de un portainjerto específico (Salazar-García, Medina-Torres, Ibarra-Estrada & González-Valdivia, 2016).

En cuanto al daño transversal que es referente a que tanto pudieron penetrar los hongos hacia el centro del tallo fue significativo únicamente la variedad de la planta por lo que puede deberse a la composición celular y diferencias en las secreciones de metabolitos secundarios como lo son las tilosas y los compuestos fenólicos en las distintas variedades de aguacate (Andrade et al., 2015), que son fuentes en algunos casos como fenoles con propiedades de defensa (Raven, 1983).

R. brunnea se destacó al tener el mayor avance longitudinal de daño en tallo maduro por lo que puede sugerir que sería de gran interés ahondar más en que este pudiese producir algún tipo de enzimas degradantes de la pared celular. Las enzimas son consideradas en contribuir un papel importante en la patogénesis de hongos en sus plantas hospederas (Annis & Goodwin, 1997). La importancia del estudio más profundo de esta especie es que está muy emparentada con *Raffaelea lauricola*, ya que comparten en su árbol filogenético la misma ramificación extrema (Dreaden et al., 2014) y puede utilizarse como modelo para seguir estudiando fuentes de resistencia entre el germoplasma mexicano.

El hongo *Fusarium* sp. presentó ligeramente mayor daño en brote tierno, sin embargo, el árbol parasitado por *Mycocorthyus vescus* del cual se aisló presentaba daños en las ramas relativamente jóvenes (Figura 13), con un síntoma similar a lo encontrado en la enfermedad denominada “Dutch Elm Disease” con un síntoma particular llamado “branch flagging” donde ramas que no están juntas se empiezan a marchitar (Gonthier, 2013), esta situación empieza de la parte de las ramas y avanza descendente e incluso llega a secar todo el árbol al llegar al tronco principal (Figura 14), similar a lo encontrado en ‘Hass ’



Figura 13. Daño causado por *Fusarium* sp. asociado al escarabajo ambrosial *Mycocorthyus vesus*, en Lázaro Cárdenas, la Trinitaria, Chiapas, México

De acuerdo con lo encontrado 'Hass' y 'Méndez No. 1' tuvieron el mayor avance de daño interno en tallo maduro, tallo tierno y en daño transversal, mientras que 'Pionero' fue el que presentó menor daño interno, el cual consistentemente no presentó sintomatología externa. Cabe recalcar también que la 'HxP 83' mostró una particularidad, daño interno limitado únicamente a la médula, por lo tanto, no presentó sintomatología externa. 'Méndez No. 1' es un mutante derivado de 'Hass' (Méndez, 2000) y se ha determinado mediante secuenciación completa del genoma que 'Hass' tiene 64 % de su genoma derivado de la raza mexicana y 36 % de la raza guatemalteca (Rendón-Anaya et al., 2019). A este aspecto se sabe que la raza mexicana es resistente y la raza guatemalteca susceptible a cánceres causados por hongos como *Dothiorella* (Halma y Zentmyer, 1953) y es probable que la susceptibilidad de ambos provenga de sus genes de parte de la raza guatemalteca. Mientras que 'Pionero' proviene de la selección '120 PLS' que a su vez se generó a partir de 'Colín V-33' y este derivado de 'Fuerte', en el cual

se piensa que tiene más genes de la raza mexicana que de la guatemalteca, y de ahí su probable resistencia a los hongos estudiados.



Figura 14. Daño causado por *Fusarium* sp. asociado al escarabajo ambrosial *Myrcocorthyus vesus*, donde causa secamiento completo de la planta y llega al tronco principal por muerte descendente. Lázaro Cárdenas, la Trinitaria, Chiapas, México.

Una de las reacciones durante cualquier infección es la producción de sustancias como mecanismo de respuesta de la planta. En el caso de las tilosas las cuales son extensiones del parénquima que previenen la desecación, daño o infección de las células aledañas (Rioux et al., 1998). En evaluaciones del daño a nivel histológico de *Raffaelea lauricola* se encontró que los cultivares de aguacate respondían a la infección con el desarrollo de tilosas y geles (gomas), y en los menos susceptibles se producían menos tilosas (Inch, Ploetz, Held & Blanchette,

2012). Por otra parte, se ha reportado que la obstrucción de los elementos de vaso de xilema por tilosas reduce la conductividad *in vivo* (Collins et al., 2009), lo que explicaría el daño en hojas de síntomas parecidos a sequía y finalmente su desecamiento, debido a la probable obstrucción de transporte de agua principalmente. Por lo que, puede ser una de las razones del porqué ‘Pionero’ resultó menos susceptible a los hongos y otras más susceptibles como ‘Hass’ y ‘Méndez No. 1’.

También cabe destacar que en otros estudios se ha indicado que los elementos de vaso de xilema de ‘Hass’ son de mayor diámetro comparado con otros genotipos (Reyes-Santamaría, Terrazas, Barrientos-Priego & Trejo, 2002). Probablemente el daño y la susceptibilidad que se presentó en ‘Hass’ puede estar relacionado a lo anterior indicado, al permitir una mayor facilidad de movilidad del hongo por el xilema y, por ende, se puede especular que ‘Méndez No. 1’ sería muy parecido a ‘Hass’ debido a su origen. Esto a diferencia de variedades como ‘Pionero’ que no sufrieron daño relevante y ‘HxP 83’ donde el daño se restringió a la médula sin dañar los sistemas de conducción, lo que hace pensar que probablemente sus haces vasculares son más delgados, ya que dentro de su linaje está ‘Colín V-33’ que tiene elementos de vaso más estrechos que ‘Hass’ (Reyes-Santamaría, 2002) y en el caso de ‘HxP 83’ tiene como uno de sus progenitores a ‘Pionero’. La variabilidad en cuanto a la diferencia de tamaño de haces vasculares puede ser atribuida al porcentaje de genes que este contenga de cada raza y a la posible transgresión génica (Reyes-Santamaría et al., 2002). Otros estudios relacionados a cancros causados por el hongo *Dothiorella gregaria* donde se evaluó la enfermedad tanto en el injerto como en el portainjerto, donde la enfermedad se extendía de la unión del injerto y posteriormente avanzaba hacia arriba o hacia abajo si el portainjerto era raza

Guatemalteca, y hacia arriba únicamente si el portainjerto era raza Mexicana (Halma y Zentmyer,1953), en el caso del experimento realizado se utilizó un portainjerto de la variedad Mexicana, y los hongos no tuvieron avance hacia el portainjerto, creciendo estos sanamente después de la evaluación de daños en el injerto.

El efecto de interacción en brote maduro donde las combinaciones hongos-genotipos no son significativas, pudo deberse a los diferentes niveles de enzimas de penetración de los respectivos hongos, ya que estos juegan un papel significativo en la patogénesis al ser capaces o no de degradar la cutina y suberina (Kolattukudy,1985), donde el factor hongo fue el significativo. En el caso de daño en brote tierno donde la interacción fue significativa puede atribuirse a diferencias anatómicas de los tejidos de brotes del año (Meza-Castillo, Barrientos-Priego, Rodríguez-Pérez, & Reyes-Santamaría, 2010), además probablemente a la composición celular y diferencias en las secreciones de metabolitos secundarios como lo son los compuestos fenólicos en las distintas variedades de aguacate (Andrade-Hoyos et al., 2015). Otras sustancias que son típicas de la familia Lauraceae, al que pertenece el aguacate, son los compuestos volátiles y aceites, como es el caso de la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) que en su corteza contiene concentraciones elevadas de aldehído cinámico y en hojas eugenol que son considerados antifúngicos (Senanayake et al, 1978).

R. brunnea se destacó al tener el mayor avance de daño en brote maduro por lo que puede sugerir que sería de gran interés ahondar más en que este pudiese producir algún tipo de enzimas degradantes de la pared celular. Las enzimas son consideradas en la contribución de un papel importante en la patogénesis de hongos en sus plantas hospederas (Annis & Goodwin, 1997).

4.7 Conclusiones

Derivado del estudio se encontró que 'Hass' y 'Méndez No. 1' fueron las variedades más susceptibles a los hongos por el avance de daño interno y expresión de daño externo. Mientras que 'Pionero' fue el genotipo menos susceptible. En el resto de los genotipos hay diferencias en cuanto a daño en tejido maduro y tierno. El genotipo 'HxP 83' presentó solo daño en tejido de médula lo que no causó sintomatología externa.

4.8 Agradecimientos

Se agradece al Dr. Salvador Ochoa Ascencio de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo por haber proporcionado amablemente las cepas de hongos provenientes de Michoacán. A la Dra. María de la Cruz Espíndola Barquera de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C. por propagar los genotipos de aguacate estudiados. Se reconoce el permiso otorgado para utilizar en este estudio a la variedad Maluma, que tiene Título de Obtentor en México, al Dr. André Ernst de Allesbeste, Sudáfrica.

4.9 Literatura Citada

- Ángel-Restrepo, M., Ochoa-Ascencio, S., Fernández-Pavía, S., Vázquez-Marrufo, G., Equihua-Martínez, A., Barrientos-Priego, A. F., Correa-Suarez, M., & Saucedo-Carabez, J. R. (2019). Identificación de escarabajos ambrosiales (Coleópteros: Curculionidae) asociados a árboles de aguacate en Michoacán, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 5(2), 80-88.
- Andrade-Hoyos, P., Espíndola-Barquera, M. C., Molina-Gayosso, E., De León, C., Alvarado-Rosales, D., & López-Jiménez, A. (2015). *Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate resistentes a Phytophthora cinnamomi Rands*. Proceedings of the VIII World Avocado Congress (pp. 13-18). Lima: ProHass.
- Annis, S. L., & Goodwin, P. H. 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 1-14.
- Beckman, C. H. (1964). Host responses to vascular infection. *Annual Review of Phytopathology*, 2(1), 231-252.
- Burnell, J. N. (1988) The biochemistry of manganese in plants. In. R. D. Graham, R. J. Hannam, & N. C. Uren (Eds.), *Manganese in soils and plants* (pp. 125–137). London: Kluwer Academic Publishers.
- Carman, R. M., & Handley, P. N. (1999). Antifungal diene in leaves of various avocado cultivars. *Phytochemistry*, 50(8), 1329-1331.
- Carrillo D., Duncan R., & Peña J.E. (2012) Ambrosia beetles (Curculionidae: Scolytinae) that breed in avocado wood in Florida. *Florida Entomology*, 95, 573–579.
- Dreaden, T. J., Davis, J. M., De Beer, Z. W., Ploetz, R. C., Soltis, P. S., Wingfield, M. J., & Smith, J. A. (2014). Phylogeny of ambrosia beetle symbionts in the genus *Raffaelea*. *Fungal Biology*, 118(12), 970-978.
- Equihua-Martínez, A., Estrada-Venegas, E. G., Trujillo-Arriaga, J., de Jesús García-Avila, C., López-Buenfil, J. A., Quezada-Salinas, A., ... &

- Laureano-Ahuelican, B. (2016). Several trees of *Casuarina cunninghamiana* Miq. infested by ambrosia beetles were detected in the Centro Cultural Tijuana (N 32 31 46.48" and W 117 01 21.68"). This tree species is generally known in Mexico by the synonym. *Folia Entomológica Mexicana (nueva serie)*, 2(1), 20-21.
- Fraedrich, S. W. (2008). California laurel is susceptible to laurel wilt caused by *Raffaelea lauricola*. *Plant Disease*, 92(10), 1469-1469.
- García-Avila, C. D. J., Trujillo-Arriaga, F. J., López-Buenfil, J. A., González-Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L. F., ... & Acevedo-Reyes, N. (2016). First report of *Euwallacea* nr. *forficatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist*, 99(3), 555-556.
- Gebhardt, H., Begerow, D., & Oberwinkler, F. (2004). Identification of the ambrosia fungus of *Xyleborus monographus* and *X. dryographus* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Mycological Progress*, 3(2), 95-102. doi/10.1007/s11557-006-0080-1
- Halma, F. F., & Zentmyer, G. A. (1953). Relative susceptibility of Guatemalan and Mexican avocado varieties to *Dothiorella* canker. *California Avocado Society Yearbook*, 38, 156-158.
- Harrington, T. C. (1981). Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia*, 73, 1123–1129. <https://doi.org/10.2307/3759682>
- Harrington, T. C., Yun, H. Y., Lu, S. S., Goto, H., Aghayeva, D. N., & Fraedrich, S. W. (2011). Isolations from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*, confirm that the laurel wilt pathogen, *Raffaelea lauricola*, originated in Asia. *Mycologia*, 103(5), 1028-1036.
- Hughes, M. A., Inch, S. A., Ploetz, R. C., Er, H. L., van Bruggen, A. H. C., & Smith, J. A. (2015). Responses of swamp bay, *Persea palustris*, and avocado, *Persea americana*, to various concentrations of the laurel wilt pathogen, *Raffaelea lauricola*. *Forest pathology*, 45(2), 111-119.
- Inch, S. A., & Ploetz, R. (2011). Laurel wilt of avocado: Relationships among disease severity, water conduction, and the spatial distribution of

- Raffaelea lauricola*. In *Phytopathology* (Vol. 101, No. 6, pp. S78-S78)., St Paul: American Phytopathological Society.
- Inch, S., Ploetz, R., Held, B., & Blanchette, R. (2012). Histological and anatomical responses in avocado, *Persea americana*, induced by the vascular wilt pathogen, *Raffaelea lauricola*. *Botany*, 90(7), 627-635.
- Kolattukudy, P. E. (1985). Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 23(1), 223-250.
- Méndez Vega, C. (2000). *Avocado tree named 'Mendez No. 1'*. U.S. Patent No. PP11,173. 4 Jan. 2000. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Meza-Castillo, E., Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez-Pérez, J. E. & Reyes-Santamaría, M. I. (2010). Determinación de tamaño de muestra mediante remuestreo de características del xilema de brote de aguacate. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(12), 1531-1535.
- Ploetz, R. C., Pérez-Martínez, J. M., Smith, J. A., Hughes, M., Dreaden, T. J., Inch, S. A., & Fu, Y. (2012). Responses of avocado to laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*. *Plant Pathology*, 61(4), 801-808.
- Raven, J. A. (1983). Phytophages of xylem and phloem: a comparison of animal and plant sap-feeders. *Advances in Ecological Research*, 13, 135-234.
- Rendón-Anaya, M., Ibarra-Laclette, E., Méndez-Bravo, A., Lan, T., Zheng, C., Carretero-Paulet, L., & Farr, K. M. (2019). The avocado genome informs deep angiosperm phylogeny, highlights introgressive hybridization, and reveals pathogen-influenced gene space adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(34), 17081-17089.
- Reyes-Santamaría, I., Terrazas, T., Barrientos-Priego, A. F., & Trejo, C. (2002). Xylem conductivity and vulnerability in cultivars and races of avocado. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 97-105.
- Rioux, D., Nicole, M., Simard, M., and Ouellette, G.B. 1998. Immunocytochemical evidence that secretion of pectin occurs during gel

(gum) and tylosis formation in trees. *Phytopathology*, 88(6): 494– 505.
doi:10.1094/PHYTO.1998.88.6.494. PMID:18944900.

Salazar-García, S., Medina-Torres, R., Ibarra-Estrada, M. E., & González-Valdivia, J. (2016). Influence of clonal rootstocks on leaf nutrient concentrations in 'Hass' avocado grown without irrigation. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 22(3), 161-175.

Willingham, S. L., Pegg, K. G., Cooke, A. W., Coates, L. M., Langdon, P. W. B., & Dean, J. R. (2001). Rootstock influences postharvest anthracnose development in 'Hass' avocado. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(10), 1017-1022.

Senanayake, U. M., Lee, T. H., & Wills, R. B. H. (1978). Volatile constituents of cinnamom (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 26, 822–824.