UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ETIOLOGÍA DE LA MUERTE REGRESIVA DE ÁRBOLES DE AGUACATE EN SABINAS HIDALGO, NUEVO LEÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA

KAREN GUADALUPE CANTÚ TREVIÑO

GENERAL ESCOBEDO, N.L. **NOVIEMBRE 2022**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ETIOLOGÍA DE LA MUERTE REGRESIVA DE ÁRBOLES DE AGUACATE EN SABINAS HIDALGO, NUEVO LEÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

PRESENTA

KAREN GUADALUPE CANTÚ TREVIÑO

GENERAL ESCOBEDO, N.L. **NOVIEMBRE 2022**

ETIOLOGÍA DE LA MUERTE REGRESIVA DE ÁRBOLES DE AGUACATE EN SABINAS HIDALGO, NUEVO LEÓN

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL

COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Dra. Adriana Gutiérrez Díez
Directora

Dr. Salvador Ochoa Ascencio
Co-Director

Dr. Emilio Olivares Sáenz
Asesor

M. C. Eduardo A. García Zambrano
Asesor

Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto
Subdirectora de Posgrado e Investigación

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme concluir mis estudios de maestría.

A mis padres Miguel Cantú y Sanjuana Treviño por el apoyo brindado para la realización de mi maestría, por cada uno de los consejos, a mi hijo Damián Cantú por ser la persona más importante para la conclusión de mis estudios de posgrado. A mi hermano Miguel Cantú por estar al pendiente siempre y el apoyo brindado.

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Agronomía** por el apoyo brindado durante el periodo de mis estudios, así como permitirme el uso de las instalaciones para poder llevar a cabo mi investigación y el apoyo otorgado para la participación en diversos congresos nacionales e internacionales.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT)** de la Dirección General de Investigación de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el otorgamiento de la beca para cursar mis estudios de posgrado y el financiamiento para desarrollar esta investigación.

A la **Dra. Adriana Gutiérrez Díez** por haberme dado la oportunidad de desarrollar este proyecto de investigación siendo su tesista, por permitirme aprender de sus conocimientos, por llevarme siempre de la mano en cada uno de los pasos en esta investigación, por todo el tiempo y cada anécdota durante estos años.

Al **Dr. Salvador Ochoa Ascencio** por todo el apoyo brindado en el tiempo de mis estudios de posgrado, por cada una de los comentarios y observaciones que permitieron llegar a los resultados obtenidos.

A mis asesores, el **Dr. Emilio Olivares Sáenz** y el **M. C. Eduardo A. García Zambrano** por su apoyo en este proyecto de investigación, así como los consejos brindados.

A los productores cooperantes en esta investigación al brindarnos acceso a sus huertas: **Rancho Daberat, El Pedregal, Los Salinas, Víctor González y Orel Chapa.**

Al **Ing. Julián Robles** quien en nombre de Agroformuladora Delta, donó algunos de los fungicidas utilizados en esta investigación.

A la maestra **Nora Estela Treviño** por proporcionar el material vegetal para la realización de las pruebas de patogenicidad.

Al **M.C. Enrique González** por la paciencia al resolverme cada duda que me surgía durante el proyecto y todo el apoyo brindado para hacer los análisis de secuencias.

A mis compañeros de laboratorio: **Fernanda Villarreal, Nina Toledo, Fabiola Medina Ian Quiroz y Víctor Rivero** por cada momento dentro del laboratorio, así como la ayuda en algunos pasos del proyecto.

A los Ingenieros **Dante García** y **Jesús Lara** por sus consejos, su apoyo y todos los momentos de risas por cada anécdota contada.

A mis amigos: **Cecilia Quiroz, Phamela Acosta, Armando Martínez y Francisco Rodríguez.** por estar siempre al pendiente de mí y de cada paso durante la maestría.

A la **Familia Cantú Medrano** por estar al pendiente de mi avance, principalmente a mis abuelos: **Margarita Medrano y Miguel Cantú** quienes estuvieron muy al pendiente, ayudándome a conseguir material para las pruebas y siempre dándome ánimos para seguir adelante. A la **Familia González Cantú** quienes siempre estuvieron al pendiente y me brindaron apoyo incondicional durante estos dos años.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xix
RESUMEN	xx
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	2
1.2. Objetivos	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos específicos	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Enfermedades del aguacate	5
2.1.1. Antracnosis	5
2.1.2. Mancha de sol del aguacate	5
2.1.3. Pudrición basal o mancha negra del fruto	6
2.1.4. Tristeza del aguacatero y pudriciones de la raíz	6
2.1.5. Armillariosis o muerte por pudrición de la raíz	7
2.1.6. Pudrición de raíz por *Cylindrocarpon* y *Cylindrocladium*	7
2.1.7. Cancros	8
2.1.7.1. *Botryosphaeria* spp.	8
2.1.7.2. *Phytophthora* spp.	8

2.1.8. Marchitez del laurel 8
2.1.9. Pudrición del tallo (stem end rot) 9
2.1.10. Muerte regresiva 9
3. MATERIALES Y MÉTODOS 12
3.1. Área de estudio y toma de muestras 12
3.2. Aislamiento y obtención de cultivos puros 13
3.3. Pruebas de patogenicidad 14
3.4. Caracterización morfológica de la colonia 14
3.5. Caracterización molecular 15
3.5.1. Extracción de ADN 15
3.5.2. Amplificación y secuenciación 16
3.6. Sensibilidad *in vitro* de los aislados a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos 18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 20
4.1. Síntomas 20
4.2. Aislamiento y obtención de cultivos puros 21
4.3. Identificación morfológica 22
4.4. Pruebas de patogenicidad y características de los re-aislados 26
4.4.1. Pruebas de patogenicidad de aislados de géneros de la familia *Botryosphaeriaceae* 27
4.4.1.1. Aislados de *Lasiodiplodia* spp. 27
4.4.1.2. Aislados de *Botryosphaeria* spp. 28
4.4.2. Pruebas de patogenicidad de *Pleurostoma* spp. 38
4.4.3. Pruebas de patogenicidad de *Colletotrichum* spp. 41
4.5. Identificación molecular 42
4.6. Sensibilidad *in vitro* de los aislados obtenidos a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos 50
4.6.1. Familia *Botryosphaeriaceae* 50
4.6.1.1. Aislado de *Lasiodiplodia* spp. 50
4.6.1.2. Aislados de *Botryosphaeria* spp. 52
4.6.2. Familia *Pleurostomataceae* 72

4.6.2.1. Aislados de *Pleurostoma* spp. 72
4.6.3. Sensibilidad *in vitro* de aislados de la familia *Glomerellaceae* 76
4.7. Porcentajes de inhibición y determinación de EC_{50} 78
5. CONCLUSIONES 82
6. BIBLIOGRAFÍA 84
7. ANEXOS 93

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ubicación geográfica de las huertas del municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León, incluidas en los muestreos.	12
2	Iniciadores utilizados en la amplificación de las regiones genéticas para la identificación molecular del agente causal de la muerte regresiva de árboles de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) de Sabinas Hidalgo, N.L.	17
3	Condiciones de PCR de las regiones amplificadas para la identificación molecular del agente causal de la muerte regresiva de árboles de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) de Sabinas Hidalgo, N.L.	17
4	Fungicidas utilizados en las pruebas de sensibilidad *in vitro* de los aislados obtenidos de ramas de árboles de aguacate con síntomas de muerte regresiva.	18
5	Regiones genéticas amplificadas para la identificación molecular de cada género de los hongos aislados de ramas de aguacate de huertas de Sabinas Hidalgo, N.L.	42
6	Especies obtenidas del análisis de secuencias de las regiones amplificadas con el Software Blastn para cada uno de los aislados.	43
7	Resultados de la comparación de secuencias obtenidas utilizando el software Blastn.	46

8	Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H1Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).	50
9	Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H1Ais2 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).	52
10	Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais2 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).	54
11	Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais3B por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).	56
12	Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais3N por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).	58
13	Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais4 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).	60
14	Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais5 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).	62
15	Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H4Ais1 por efecto de cinco fungicidas a	64

cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

16 Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H4Ais2 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05). 66

17 Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H5Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05). 68

18 Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H5Ais2 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05). 70

19 Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H2Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05). 72

20 Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H4Ais3 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05). 74

21 Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05). 76

22 Valores EC_{50} de los aislados sometidos a pruebas de sensibilidad *in vitro* a cinco fungicidas. 80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Síntomas de muerte regresiva observados en árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en Sabinas Hidalgo, N.L. A) Árbol con muerte regresiva. B) Hojas secas adheridas a las ramas. C) Exudado blanquecino. D) Exudados grumosos. E) Exudados blanquecinos y grumosos en tejido necrosado. F) Tejido central marrón claro de rama en corte transversal.	20
2	Hongos aislados de ramas de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) con síntomas de muerte regresiva en huertas de Sabinas Hidalgo, N.L.	22
3	Caracterización macroscópica y microscópica de H1Ais1. A) Conidios maduros color marrón septados con estrías longitudinales. B) Capa conidiógena con paráfisis. C) Conidios inmaduros formados dentro del picnidio. D) Colonia en medio PDA a los cuatro días.	23
4	Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados H1Ais2, H3Ais2, H3Ais3B, H3Ais3N, H3Ais4, H3Ais5, H4Ais1, H4Ais2, H5Ais1 y H5Ais2. A) Micelio septado y conidios hialinos aseptados. B) Picnidios en acículas de pino.	24
5	Colonias en medio PDA de aislados del género *Botryosphaeria* obtenidos a partir de ramas de aguacate con síntomas de muerte regresiva.	24

6	Caracterización macroscópica y microscópica de aislados del género Pleurostoma. A) Colonia de 15 días del aislado H4Ais3. B) Colonia de 15 días del aislado H2Ais1. C) Micelio ramificado. D) Conidio hialino globuloso.	25
7	Caracterización macroscópica y microscópica del aislado H3Ais1. A) Colonia de 15 días del aislado del género *Colletotrichum.* B) Micelio hialino teñido con azul de lactofenol. C) Conidio hialino globuloso.	26
8	Pruebas de patogenicidad del aislado H1Ais1. A) Colonia del aislado original a los cuatro días. B) Colonia del re-aislado a los cuatro días. C) Síntomas en la rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de ramas testigo.	27
9	Pruebas de patogenicidad del aislado H1Ais2. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.	28
10	Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais2. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación; D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo	29
11	Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais3B. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.	30
12	Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais3N. A) Colonia del aislado original a los 10 días. B) Colonia del re-aislado a los 10 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte	31

longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

13 Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais4. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo. 32

14 Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais5. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo. 33

15 Pruebas de patogenicidad del aislado H4Ais1. A) Colonia del aislado original a los 10 días. B) Colonia del re-aislado a los 10 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo. 34

16 Pruebas de patogenicidad del aislado H4Ais2. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo. 35

17 Pruebas de patogenicidad del aislado H5Ais1. A) Colonia del aislado original a los 15 días. B) Colonia del re-aislado a los 15 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo. 36

18 Pruebas de patogenicidad del aislado H5Ais2. A) Colonia del aislado original a los 10 días. B) Colonia del re-aislado a los 10 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte 37

longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

19 Pruebas de patogenicidad del aislado H2Ais1. A) Colonia del aislado original a los 15 días. B) Colonia del re-aislado a los 15 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo. 39

20 Pruebas de patogenicidad del aislado H4Ais3. A) Colonia del aislado original a los 15 días. B) Colonia del re-aislado a los 15 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo. 40

21 Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais1. A) Colonia del aislado original a los 15 días. B) Colonia del re-aislado a los 15 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo. 42

22 Crecimiento micelial del aislado H1Ais1 a los cuatro días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol. 51

23 Crecimiento micelial del aislado H1Ais2 a los 10 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol. 53

24 Crecimiento micelial del aislado H3Ais2 a los ocho días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol. 55

25 Crecimiento micelial del aislado H3Ais3B a los siete días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol. 57

26	Crecimiento micelial del aislado H3Ais3N a los seis días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	59
27	Crecimiento micelial del aislado H3Ais4 a los cinco días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	61
28	Crecimiento micelial del aislado H3Ais5 a los siete días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	63
29	Crecimiento micelial del aislado H4Ais1 a los ocho días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	65
30	Crecimiento micelial del aislado H4Ais2 a los ocho días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	67
31	Crecimiento micelial del aislado H5Ais1 a los 12 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	69
32	Crecimiento micelial del aislado H5Ais2 a los cinco días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	71
33	Crecimiento micelial del aislado H2Ais1 a los 18 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	73
34	Crecimiento micelial del aislado H4Ais3 a los 18 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	75
35	Crecimiento micelial del aislado H3Ais1 a los 10 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.	77

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Buffer de extracción de ADN.	93
2	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia* spp. (posibles especies: *L. citricola, L. parva* o *L. theobromae).*	93
3	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botryosphaeria dothidea.*	94
4	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Pleurostoma richardsiae.*	95
5	Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum siamense.*	95

RESUMEN

La muerte regresiva del aguacatero es una enfermedad que se caracteriza por el marchitamiento de las hojas que permanecen adheridas a las ramas, necrosis en la corteza y coloración rojiza al interior de las ramas en las zonas afectadas. El presente estudio se llevó a cabo en cinco huertas de aguacate criollo raza Mexicana en el municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León, donde se realizaron muestreos de ramas de árboles con síntomas de cancros y muerte regresiva. Como hipótesis de esta investigación se planteó que hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* están asociados a la muerte regresiva de árboles de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) en huertas de Sabinas Hidalgo, Nuevo León. El objetivo general fue identificar el agente causal de esta enfermedad.

Se obtuvieron 14 aislados fungosos a partir de las ramas colectadas de árboles con síntomas de muerte regresiva, los aislados fueron identificados morfológica y molecularmente a través de la amplificación de regiones genéticas por PCR; mediante el análisis de las secuencias genéticas amplificadas se identificaron a los géneros *Lasiodiplodia* (un aislado) y *Botryosphaeria* (diez aislados) pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae.* Se obtuvieron tres aislados pertenecientes a los géneros *Pleurostoma* (dos aislados) y *Colletotrichum* (un aislado). La patogenicidad de cada

aislado fue comprobada por inoculación de discos de micelio en ramas sanas de aguacate. La sensibilidad *in vitro* de los aislados a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos y la EC_{50} de estos fungicidas fueron determinadas mediante la técnica de placa envenenada.

Los resultados obtenidos determinan a los géneros *Lasiodiplodia, Botryosphaeria, Pleurostoma* y *Colletotrichum* como agentes causales de muerte regresiva de árboles de aguacate en el municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León.

ABSTRACT

Avocado dieback is a disease characterized by wilt of leaves that remain attached to the branches, necrosis in the bark and affected areas that show a reddish coloration inside the branches. The present study was carried out in five avocado orchards in the municipality of Sabinas Hidalgo, Nuevo Leon, where branches of avocado tree with symptoms of cankers and dieback were sampled. The hypothesis of this research was that fungi of the *Botryosphaeriaceae* family are associated with the dieback of avocado trees *Persea americana* var. *drymifolia* affected by dieback in orchards in Sabinas Hidalgo, Nuevo Leon. The general objective of the study was to identify the causal agent of dieback disease in this area.

Fourteen fungal isolates were obtained from branches collected from trees with symptoms of dieback, the isolates were identified morphologically and molecularly by PCR amplification of genetic regions, by sequence analysis of amplified genetic regions were identified the genera *Lasiodiplodia* (one isolate) and *Botryosphaeria* (ten isolates) belonging to the family *Botryosphaeriaceae.* Three isolates belonging to the genera *Pleurostoma* (two isolates) and *Colletotrichum* (one isolate) were obtained. The pathogenicity of each isolate was tested by inoculation of mycelial discs on avocado

branches. The *in vitro* sensitivity to five fungicides of different chemical groups and the EC_{50} each of these fungicides was determined by the poison plate technique.

The results obtained allow to associate the genera *Lasiodiplodia, Botryosphaeria, Pleurostoma* and *Colletotrichum* as causal agents of dieback of avocado trees in the municipality of Sabinas Hidalgo, Nuevo Leon.

1. INTRODUCCIÓN

En sus diferentes etapas de desarrollo, el cultivo de aguacate (*Persea americana*), así como otras especies frutales son afectados por hongos fitopatógenos. Las enfermedades causadas por estos patógenos producen una gran variedad de síntomas en sus hospederos como tizones, manchas cloróticas, costras, ahogamientos, manchas necróticas, podredumbres húmedas o secas y muerte regresiva (Díaz *et al*., 2016). En el cultivo de aguacate, especies de la familia *Botryosphaeriaceae* han sido asociadas a pudrición del pedúnculo de los frutos en postcosecha, cancros y muerte regresiva de las ramas. Las plantas afectadas por miembros de esta familia presentan marchitamiento de hojas y muerte regresiva, clorosis foliar y madera seca con manchas o decoloración circular en los conductos del xilema (Olmo *et al*., 2016).

Los hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* tienen la habilidad de pasar de hábito endófito a patógeno en plantas que se encuentran bajo estrés, esta familia es de gran importancia por las enfermedades que ocasiona en cultivos de importancia agrícola en todo el mundo, por lo que son una amenaza para los cultivos en condiciones no óptimas de desarrollo (Mondragón-Flores *et al*., 2021).

La muerte regresiva en el cultivo de aguacate ha sido reportada en España (García *et al.,* 2017), Chile (Valencia *et al.,* 2019), Perú (Rodríguez-Gálvez *et al.,* 2021) y Estados Unidos (McDonald y Eskalen, 2011). En Atlixco, Pue., fue reportada la muerte

regresiva en árboles de aguacate variedad ‘Hass’ (Becerra *et al*., 2019) sin embargo, no hay reportes que indiquen si la incidencia de esta enfermedad es de importancia económica.

En huertos de aguacate del municipio de Sabinas Hidalgo, N.L. fueron detectados árboles de aguacate raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*) con síntomas de muerte regresiva, por lo que la determinación del agente causal de esta enfermedad podría contribuir a disminuir el impacto en los sistemas productivos de aguacate en el Estado, así como en las regiones productoras de aguacate en México.

1.1. Hipótesis

Hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* están asociados a la muerte regresiva de árboles de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) en huertas de Sabinas Hidalgo, Nuevo León.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Identificar el agente causal de la muerte regresiva en árboles de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) en huertas de Sabinas Hidalgo, Nuevo León.

1.2.2. Objetivos específicos

1. Localizar árboles de aguacate var. *drymifolia* con síntomas de muerte regresiva en huertas comerciales de aguacate de Sabinas Hidalgo, N.L.

2. Aislar y determinar la patogenicidad de los hongos de ramas de árboles de aguacate con síntomas de muerte regresiva en huertas de Sabinas Hidalgo, N.L.

3. Identificar morfológica y molecularmente los hongos aislados de ramas de árboles de aguacate con síntomas de muerte regresiva.

4. Evaluar *in vitro* la sensibilidad de los hongos aislados de ramas de árboles de aguacate con síntomas de muerte regresiva a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

México es el primer productor de aguacate en el mundo con 2,393,849 t, lo que equivale al 32% del volumen mundial. Este fruto es uno de los productos más exitosos de la exportación agroalimentaria nacional. Las exportaciones han mostrado una tasa de crecimiento del 12% en la última década, la demanda de este fruto está en aumento con una tasa del 12.7% del crecimiento anual. Las exportaciones mexicanas en el año 2020 fueron destinadas a Estados Unidos (1,045,00 t), Canadá (92,000 t) y Japón (71,000 t) (SAGARPA, 2017; SIAP, 2021).

En el estado de Nuevo León son cultivadas variedades criollas de la raza Mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*) en huertos de traspatio y comerciales en los municipios de la zona norte: Bustamante, Sabinas Hidalgo, Monterrey y San Nicolás de los Garza. En el municipio de Sabinas Hidalgo se encuentran variedades de criollos mejorados como: Anita, Pepe, Floreño, Cuervo, entre otros (Acosta *et al*., 2013; Gutiérrez-Díez *et al*., 2015). La producción de aguacate criollo en Nuevo León en el año 2021 fue de 1,347.15 t en 699 ha, Sabinas Hidalgo ocupa el cuarto lugar de producción con 5.72% de la producción estatal.

2.1. Enfermedades del aguacate

2.1.1. Antracnosis

Es una de las enfermedades más importantes del aguacate, es causada por *Colletotrichum* spp. y causa pudrición de flores y mancha de frutos en el árbol. En el fruto los síntomas de la enfermedad se desarrollan después de la cosecha y durante su maduración. El desarrollo de la enfermedad en el fruto sucede durante el traslado al mercado debido a que el fruto se ablanda un poco y las esporas del hongo germinan, atraviesan y mancha la cáscara extendiéndose rápidamente a los frutos vecinos. Para el control de la enfermedad se requiere la implementación de estrategias en precosecha y postcosecha, la aplicación de fungicidas después de la cosecha es la estrategia más importante para la gestión de la enfermedad (GIIIA, 2013; Dann *et al.,* 2013).

2.1.2. Mancha de sol del aguacate

Esta enfermedad está asociada con el viroide de la mancha de sol del aguacate o *Avocado Sunblotch Viroid* (ASBVd), se manifiesta con la disminución en el vigor del árbol, el rendimiento y la calidad del fruto. Los síntomas característicos en frutos para el diagnóstico de la enfermedad son la presencia de grietas amarillas que pueden tornarse rojizas, blancas, púrpuras o negras. Los frutos sintomáticos no son comerciales por lo que son desechados, el rendimiento en árboles infectados resulta en una disminución del rendimiento hasta el 76% y pueden tener hasta el 78% de frutos que presenten síntomas. (GIIIA, 2013).

2.1.3. Pudrición basal o mancha negra del fruto

Esta enfermedad es causada por *Phytophthora heveae*, afecta primeramente a los frutos que se encuentran en la parte baja del árbol. Las esporas del patógeno se desarrollan en frutos que han caído del árbol, estas esporas son transportadas a los frutos sanos por medio de la lluvia y el viento. Este patógeno invade todo el fruto en cuatro días y si se mantiene la lluvia o una alta humedad relativa a temperaturas superiores de 25°C, el patógeno esporula masivamente. A partir de las esporulaciones se generan nuevas infecciones. Los frutos infectados caen al suelo y es donde *Phytophthora* forma estructuras de resistencia para sobrevivir o producir una mancha negra que puede infectar el tronco (GIIIA, 2013).

2.1.4. Tristeza del aguacatero y pudriciones de la raíz

La raíz del cultivo de aguacate es atacada y podrida por diversos hongos y fitopatógenos que viven en el suelo. Las raíces afectadas por pudrición no absorben agua y los síntomas son parecidos en el follaje independientemente si la causa es marchitamiento, amarillamiento y follaje seco, y muerte del árbol. Las enfermedades derivadas de la pudrición de raíces son: tristeza, colapso y pudrición blanca, causadas por *Phytophthora cinnamomi, Ganoderma lucidum* y *Rosellinia necatrix,* respectivamente. La identificación en campo de la tristeza del aguacatero es mediante la presencia de flacidez y marchitamiento de hojas, secado y muerte del follaje, defoliación de la punta a la base de las ramas, manchas negras en las raíces y frutos de menor tamaño (GIIIA, 2013).

2.1.5. Armillariosis o muerte por pudrición de la raíz

Es una enfermedad letal de propagación lenta que provoca el secamiento y muerte de los árboles de aguacate, esta enfermedad es causada por el hongo del suelo *Armillaria* spp. que ataca y pudre el cambium y la madera de las raíces principales. Los árboles afectados por este hongo presentan decaimiento, hojas cloróticas, poco crecimiento y hojas secas que conducen a la muerte del árbol. *Armillaria* ataca las raíces y madera enterrada, las raíces sanas son infectadas cuando existe contacto con los rizomorfos o cuando el micelio crece de la madera infectada del suelo. Algunas especies de *Armillaria* no producen rizomorfos y se mueven a través de filamentos miceliales. Una vez que el árbol de aguacate se seca, el patógeno se extiende a otros árboles. El control de esta enfermedad es difícil, la eliminación de todos los restos orgánicos en las zonas nuevas no garantiza la ausencia de la enfermedad (GIIIA, 2013; Menge y Ploetz, 2003).

2.1.6. Pudrición de raíz por *Cylindrocarpon* y *Cylindrocladium*

En varios países se ha asociado a *Cylindrocarpon* y *Cylindrocladium* spp. a enfermedades de raíz en aguacate, los síntomas en casos graves se manifiestan con la aparición de hojas cloróticas, se vuelven color marrón y caen antes de la muerte del árbol. Los árboles afectados presentan una podredumbre de raíz grave. Esta enfermedad ha sido observada en árboles jóvenes de vivero y en árboles recién transplantados (Dann *et al.,* 2013).

2.1.7. Cancros

2.1.7.1. *Botryosphaeria* spp.

En los cancros causados por *Botryosphaeria parva* y *Botryosphaeria dothidea* los primeros síntomas sobre las ramas son las secreciones blancas, en el interior se forma una lesión compacta, rojiza y alargada de bordes definidos, en la corteza se observa la presencia de grietas, lesiones que afecta el tejido conductor causando necrosis vascular, con frecuencia, varias lesiones se unen y se presentan daños de grandes extensiones de tejido. Es común encontrar ramas afectadas, estas ramas muestran muerte regresiva. El patógeno requiere de heridas para penetrar y es altamente invasivo; se encuentra en cancros crónicos de ramas viejas de donde se dispersan las esporas a los tejidos sanos (GIIIA, 2013).

2.1.7.2. *Phytophthora* spp.

Varias especies de *Phytophthora* causan cancros en el tronco, ramas, corona y raíces del aguacate, los síntomas se originan bajo el suelo y se pueden extender 3 m hacia arriba en el tronco y las ramas, los síntomas foliares en casos avanzados de cancro del tronco suelen ser similares a los síntomas causados por la pudrición de la raíz por *Phytophthora*. Los cancros exudan una savia viscosa de color rojo que contiene azúcar, al secarse se vuelve en un polvo blanco a marrón, los tejidos se vuelven color marrón (Menge y Ploetz, 2003).

2.1.8. Marchitez del laurel

Esta enfermedad afecta a las plantas de la familia *Lauraceae*, es causada por *Raffaelea lauricola,* simbionte del escarabajo *Xyleborus glabratus* que pasan la mayor

parte de su ciclo de vida dentro del árbol. Las hembras transportan las esporas del patógeno en sus micangios de un árbol a otro, cuando un escarabajo hembra se posa en el tallo o rama y perfora la madera. Los árboles afectados se marchitan rápidamente, las hojas se tornan de un color verde olivo a un color marrón a medida que mueren. La defoliación sucede en un plazo de 3 a 4 meses, los árboles afectados por la marchitez del laurel no suelen recuperarse. El diagnóstico de la enfermedad se basa en la identificación del escarabajo *X. glabratus* en los árboles afectados y la confirmación de la marchitez del laurel generalmente se logra mediante el aislamiento del hongo en laboratorio a partir de muestras de madera recolectadas de árboles con síntomas de la enfermedad (Dann *et al.,* 2013; Mayfield *et al.,* 2019).

2.1.9. Pudrición del tallo (stem end rot)

En esta enfermedad la pudrición del tallo comienza en su extremo, los síntomas se manifiestan mediante la aparición de una podredumbre marrón oscuro a negro con márgenes definidos, en una fase avanzada de la enfermedad se puede observar crecimiento micelial en la superficie de las lesiones bajo condiciones de humedad. La podredumbre del tallo puede ser causada por diversos hongos como *Botryosphaeria* spp. y *Colletotrichum gloeosporioides* entre otros (Dann *et al.,* 2013).

2.1.10. Muerte regresiva

La muerte regresiva se manifiesta con el marchitamiento de hojas que permanecen unidas, ramas secas y necrosis en la corteza; el patógeno se extiende de manera longitudinal por debajo de la corteza o bien invade los vasos conductores del xilema causando la necrosis del tejido. El oscurecimiento de las ramas se traduce en necrosis

completa con aparición frecuente de exudados en las zonas necrosadas (Arjona-Girona *et al*., 2015; Becerra *et al.,* 2019).

La entrada de hongos al xilema del huésped provoca la invaginación de células parenquimatosas para formar tilosas y la secreción de resinas (Inch *et al*., 2012); estas formaciones tilóticas en el sistema vascular provocan la obstrucción de los vasos del xilema con la pérdida de conducción de agua y marchitamiento derivando en la muerte del árbol (Mayfield *et al*., 2008).

Entre los agentes causales de esta enfermedad se encuentran hongos de la familia *Botryosphaeriaceae;* esta familia incluye especies saprófitas, endófitas y patógenas asociadas principalmente a plantas leñosas. Varias especies han sido asociadas a cancros de las ramas, pudrición de brotes en árboles de aguacate y muerte regresiva. Los géneros que con más frecuencia se asocian a daños en el aguacatero son: *Diplodia, Barriopsis, Lasiodiplodia, Neofusicoccum* y *Botryosphaeria* (García *et al*., 2017).

Los cancros causados en aguacate por hongos de esta familia presentan un exudado de savia rojiza que al secarse forma un polvo blanco, por debajo del cancro la madera presenta una coloración marrón, en ocasiones de color rojizo. Al realizar un corte transversal a nivel del cancro se puede observar necrosis en forma de cuña que se extiende al interior del xilema, la corteza puede presentar grietas o estar ligeramente hundida (McDonald y Eskalen, 2011). De infectarse gran parte del xilema, el tallo puede colapsar y las hojas se vuelven color marrón, pero permanecen unidas a las ramas (Menge y Ploetz, 2003).

En California, Estados Unidos, fueron identificadas especies de la familia *Botryosphaeriaceae* como los hongos más abundantes aislados de ramas en

plantaciones de aguacate ‘Hass’ con presencia de muerte regresiva y cancros (McDonald y Eskalen, 2011). En Perú, Rodríguez-Gálvez y colaboradores (2021) obtuvieron aislamientos de diversas especies del género *Lasiodiplodia* en las regiones de La Libertad (36.4%), Lambayeque (31.2%), Lima (22.1%) e Ica y Piura (5.2%), provenientes de muestras de árboles de aguacate con síntomas de muerte regresiva. En España, fueron identificados 68 aislados asociados a muerte regresiva pertenecientes a los géneros *Colletotrichum, Lasiodiplodia y Neofusicoccum* en huertas comerciales de aguacate ‘Hass’; *Neofusicoccum parvum* fue el principal agente causal (Arjona-Girona *et al*., 2019).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio y toma de muestras

El presente estudio fue realizado en el municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León durante el periodo de agosto 2020 a julio 2022, fueron seleccionadas cinco huertas donde se detectaron árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) con síntomas de muerte regresiva mediante recorridos en las mismas. La identificación y ubicación geográfica de cada una de las huertas se encuentra en el Cuadro 1. Durante los recorridos se colectaron muestras de ramas y brotes de árboles de aguacate con cancros, exudados grumosos, tejido central marrón, necrosis y/o muerte regresiva.

Cuadro 1. Ubicación geográfica de las huertas del municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León, incluidas en los muestreos.

Identificación	Nombre	Ubicación
H1	Rancho Daberat	26°29'14.8"N 100°10'40.6"W
H2	El Pedregal	26°29'52.5"N 100°11'47.5"W
H3	Los Salinas	26°29'53.4"N 100°11'22.3"W
H4	Víctor González	26°29'55.7"N 100°11'23.6"W
H5	Orel Chapa	26°29'55.3"N 100°11'21.3"W

3.2. Aislamiento y obtención de cultivos puros

Las muestras colectadas se transportaron al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía en el Campus Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en donde fueron lavadas con agua corriente y jabón para la eliminación de tierra y otros contaminantes. Posteriormente se realizaron cortes transversales de las ramas y brotes, y se obtuvieron trozos de la parte central afectada de aproximadamente 3 mm, los trozos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% durante 20 s seguido de tres enjuagues con agua bidestilada estéril. Una vez desinfectados los trozos fueron establecidos en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar) acidificado con ácido tartárico al 10% e incubadas a 25°C durante 72 h en oscuridad para la obtención de colonias.

A partir de las colonias obtenidas de las muestras de ramas y brotes, se aislaron colonias nuevas en cajas Petri con medio PDA acidificado que se incubaron a las condiciones mencionadas hasta la formación de conidios/esporas. Se obtuvieron cultivos monospóricos de las colonias aisladas mediante la dilución de suspensión de esporas en medio PDA con la técnica de rayado de placa. A partir de las colonias monospóricas que fueron incubadas durante 24-48 h en oscuridad a 25°C, se tomó un fragmento de la colonia para siembra en placa nueva con medio PDA, de esta colonia monospórica se realizaron tres copias que se utilizaron para la caracterización morfológica, la caracterización molecular y las pruebas de patogenicidad.

3.3. Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron por medio de inoculación de discos de micelio de 5 mm de cultivo monospórico con crecimiento activo (siete días), en tres ramas jóvenes y sanas de 30 cm de árboles de aguacate, por medio de tres heridas alternadas y equidistantes; como control se utilizaron dos ramas jóvenes y sanas con heridas sin inoculación de micelio, todas las heridas de las ramas fueron cubiertas con Parafilm (Bemis™). Las ramas fueron incubadas en cámaras húmedas realizadas con recipientes de sello hermético en oscuridad a 25°C durante 14 días. Los resultados de las inoculaciones se evaluaron a los siete y 14 días posteriores a su realización. A los 14 días se reprodujeron los síntomas de la enfermedad en las ramas inoculadas con los cultivos monospóricos, por lo que se procedió al re-aislamiento del patógeno a partir del tejido necrótico de las ramas infectadas en cajas Petri con medio PDA acidificado, e incubadas de la manera ya mencionada por siete días, para la verificación de las características morfológicas de la colonia.

3.4. Caracterización morfológica de la colonia

Los aislados monospóricos sembrados en medio PDA fueron incubados a 25°C en oscuridad durante siete días, se determinó el género observando las características microscópicas y macroscópicas como forma, color y textura. La identificación de los aislados se realizó mediante la comparación de las colonias con los estudios de Phillips y colaboradores (2013).

3.5. Caracterización molecular

3.5.1. Extracción de ADN

A partir de las colonias monospóricas de los aislados se realizó la extracción de ADN mediante el protocolo de Lee y Taylor (1990) modificado de acuerdo con lo que se describe enseguida. Los monospóricos fueron sembrados en medio líquido Papa-Dextrosa e incubados durante dos semanas a 25°C en oscuridad, el micelio fue secado a 37°C durante 1 h y macerado con nitrógeno líquido. Cada extracción de ADN se realizó por duplicado, el micelio seco y macerado se dividió en dos para colocarse en tubos de 2 mL a los que se agregó 1 mL de buffer de extracción de ADN (Anexo 1) previamente calentado a 65°C. Las muestras fueron agitadas en vórtex por 1 min, después incubadas a 65°C por 1 h en agitación constante. Posteriormente se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron por 30 s para centrifugarse a 13,400 rpm durante 10 min; se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos de 2 mL y se adicionó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para agitación en vórtex por 30 s y posterior centrifugación a 13,400 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue transferido a tubos de 1.5 mL dónde se agregó un volumen de isopropanol y se mezcló suavemente para precipitar el ADN, las muestras con isopropanol se mantuvieron a -70°C durante 30 min para después centrifugarse a 13,400 rpm por 10 min. El sobrenadante fue desechado y las pastillas fueron secadas al aire para posteriormente ser lavadas en dos ocasiones con etanol al 70%; previo secado de las pastillas, se re-suspendieron en 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA pH 8).

La integridad del ADN fue revisada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, el gel fue corrido a 80 V durante 40 min en buffer de corrida TBE 1X y fue visualizado en un fotodocumentador BioDoc-It™ Imaging System.

3.5.2. Amplificación y secuenciación

Para la identificación molecular se realizó la amplificación de las regiones genéticas ITS (internal transcribed spacer), TEF 1-alfa (translation elongation factor 1-alfa), TUB2 (tubulin beta chain 2), SSU (small subunit), LSU (large subunit) y RPB2 (RNA polymerase II complex); los iniciadores utilizados se encuentran en el Cuadro 2. La mezcla de reacción de PCR se llevó a cabo a un volumen de 6.25 µl y consistió en: 20 ng de ADN total, 2.5 mM de $MgCl_2$, 1X Buffer *Taq* polimerasa (Promega®), 0.02 mM de dNTP mix (Promega®), 0.02 pmol de cada iniciador y 0.25 U de *Taq* polimerasa (Promega®). La PCR fue desarrollada en un termociclador (Veriti®), las condiciones de PCR (programa térmico) utilizadas para cada región amplificada se muestran en el Cuadro 3. Los fragmentos amplificados fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X utilizando el marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega® DNA Ladder 1 Kb).

Los fragmentos amplificados y los fragmentos amplificados y recuperados de gel fueron enviados a la empresa Macrogen (Seoul, Korea) para su secuenciación. Las secuencias resultantes fueron editadas en el software SeqAssem ver. 07/2008 (Hepperle, 2004), posteriormente se realizó la alineación y comparación con homología del 98-100% con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el software Blast (Basic Local Alignment Search Tool).

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la amplificación de las regiones genéticas para la identificación molecular del agente causal de la muerte regresiva de árboles de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) de Sabinas Hidalgo, N.L.

Región	Iniciadores	Referencias
ITS	ITS1 5'-(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)-3' ITS4 5'-(TCCTCCGCTTATTGATATGC)-3'	White *et al.,* 1990
Tef1	EF1-688F 5'-(CGGTCACTTGATCTACAAGTGC)-3' EF1-1251R 5'-(CCTCGAACTCACCAGTACCG)-3'	Alves *et al.,* 2008
Tub2	Bt2a 5'-(GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC)-3' Bt2b 5'-(ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC)-3' T1 5'-(AACATGCGTGAGATTGTAAGT)-3'	Glass y Donaldson, 1995; O'Donnell y Cigelnik, 1997
SSU	NS1 5'-(GTAGTCATATGCTTGTCTC)-3' NS4 5'-(CTTCCGTCAATTCCTTTAAG)-3'	White *et al.,* 1990
LSU	LR0R 5'-(ACCCGCTGAACTTAAGC)-3' LR5 5' (CGATCGATTTGCACGTCAGA) 3'	Vilgalys y Hester, 1990
RPB2	RPB2-LasF 5' (GGTAGCGACGTCACTCCT) 3' RPBR-LasR 5' (GCGCAAATACCCAGAATCAT) 3'	Cruywagen *et al.,* 2017

Cuadro 3. Condiciones de PCR de las regiones amplificadas para la identificación molecular del agente causal de la muerte regresiva de árboles de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) de Sabinas Hidalgo, N.L.

Región	Programa térmico
ITS	95°C x 2 min 40 ciclos (95°C x 30 s, 54-58°C x 30 s, 72°C x 60 s) 72°C x 5 min
Tef1	95°C x 2 min 30 ciclos (95°C x 30 s, 50-62°C x 30 s, 72°C x 30 s) 72°C x 5 min.
Tub2	95°C x 2 min 35 ciclos (94°C x 60 s, 54-64°C x 60 s, 72°C x 90 s) 72°C x 5 min.
SSU	94°C x 2 min 35 ciclos (94°C x 60 s, 56°C x 60 s, 72°C x 90 s) 72°C x 5 min.
LSU	94°C x 2 min 35 ciclos (94°C x 60 s, 52°C x 60 s, 72°C x 90 s) 72°C x 5 min.
RPB2	94°C x 2 min 35 ciclos (94°C x 60 s, 58°C x 60 s, 72°C x 90 s) 72°C x 5 min.

3.6. Sensibilidad *in vitro* de los aislados a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos

Para evaluar la sensibilidad de los aislados obtenidos a cinco fungicidas de diferente grupo químico se utilizó la técnica de placa envenenada (medio PDA + fungicida). Veinticinco tratamientos fueron evaluados por cada aislado bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los tratamientos consistieron en concentraciones de 0 (testigo), 1, 10, 100 y 1000 ppm de cada fungicida. Los fungicidas evaluados se encuentran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Fungicidas utilizados en las pruebas de sensibilidad *in vitro* de los aislados obtenidos de ramas de árboles de aguacate con síntomas de muerte regresiva.

Ingrediente activo (i.a.)	Nombre comercial	Concentración i.a.	Formulación
Tiabendazol	ZIO® 60 WP (Lapisa)	600 g/kg	PH*
Tiofanato metílico	Cercobin®-M (BASF)	700 g/kg	PH*
Hymexazol	Tachigaren® 30 SL (Summit Agro)	360 g/L	LS**
Tebuconazol	Folicur® 250 EW (Bayer)	250 g/L	EW***
Propiconazol	Sanadel® (AGROFormuladora Delta)	250 g/L	CE****

*Polvo humectable, **Líquido soluble, ***Emulsión acuosa concentrada, ****Concentrado emulsionable

Discos de micelio con crecimiento activo de 5 mm de diámetro fueron colocados en el centro de las cajas Petri con el PDA adicionado, las cajas fueron incubadas a 25°C durante 5-18 días según cada aislado. Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se realizaron mediciones del crecimiento en dos direcciones

perpendiculares con un vernier digital hasta que el testigo cubrió la placa o detuvo su crecimiento, el promedio de las dos medidas fue utilizado para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los aislados.

La fórmula para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue:

$$ICR(\%) = \left(\frac{(CRT - CRF)}{CRT}\right) * 100$$

Dónde,

ICR (%): porcentaje de inhibición del crecimiento radial

CRT: crecimiento radial en mm del testigo (0 ppm).

CRF crecimiento radial en mm promedio de los tratamientos.

El análisis de varianza de los porcentajes de inhibición se realizó a través del modelo lineal generalizado, la comparación de medias se realizó por el método Tukey (0.05). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico R versión 4.2.1 (R Core Team, 2022) y la librería Agricolae (Mendiburu, 2015). La determinación de la EC_{50} para cada tratamiento se realizó mediante regresión no lineal del logaritmo de la concentración del fungicida y el porcentaje de inhibición. Los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism versión 9.4.1 (GraphPad Software, LLC).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntomas

Durante los recorridos realizados en las huertas, los síntomas observados en árboles con muerte regresiva fueron: cancros con exudados grumosos, exudados blanquecinos, tejido necrosado, tejido marrón claro en corte transversal de rama, hojas y ramas secas, hojas que permanecían adheridas a las ramas; al realizar los cortes transversales de las ramas con síntomas en campo, se observó un líquido viscoso al tacto (Figura 1).

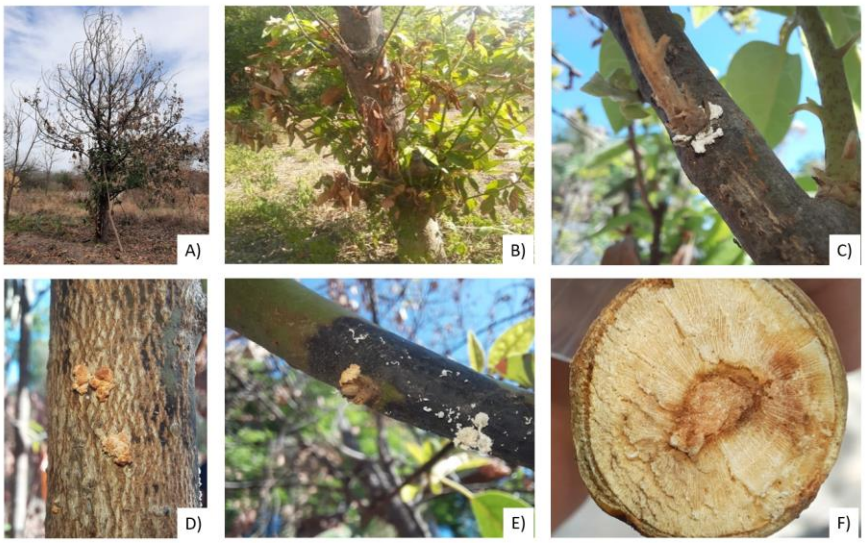

Figura 1. Síntomas de muerte regresiva observados en árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en Sabinas Hidalgo, N.L. A) Árbol con muerte regresiva. B) Hojas secas adheridas a las ramas. C) Exudado blanquecino. D) Exudados grumosos. E) Exudados blanquecinos y grumosos en tejido necrosado. F) Tejido central marrón claro de rama en corte transversal.

Los síntomas observados en campo concuerdan con los reportados en el estudio de Alama y colaboradores (2006), donde mencionan que el síntoma más sobresaliente en árboles con muerte regresiva fue la presencia de cancros con exudados grumosos y blancos de diferentes tamaños con una ubicación indistinta en troncos y ramas de árboles jóvenes y adultos. Además, observaron tejido necrosado de color marrón oscuro a nivel del cancro, la tonalidad del tejido aumentaba de intensidad a medida que se profundizaba, comprometiendo el tejido central.

Los síntomas incluyen la presencia de ramas con hojas e inflorescencias marchitas con frutos pequeños con un desarrollo anormal, la defoliación severa y la muerte del árbol es originada por la necrosis del follaje; en ocasiones se realizan podas severas a los árboles afectados, pero en muchos de los casos esta medida cultural no es efectiva ya que la corteza ya está infectada o presenta necrosis (Alama *et al.,* 2006; Valencia *et al.,* 2019)

4.2. Aislamiento y obtención de cultivos puros

A partir de las muestras colectadas de árboles con síntomas de muerte regresiva durante los recorridos, se realizó el aislamiento y purificación de 14 hongos. Los aislados obtenidos por huerta fueron: H1 dos aislados, H2 un aislado, H3 seis aislados, H4 tres aislados y H5 dos aislados (Figura 2).

Figura 2. Hongos aislados de ramas de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) con síntomas de muerte regresiva en huertas de Sabinas Hidalgo, N.L.

4.3. Identificación morfológica

Al realizar la comparación de las características macroscópicas y microscópicas de las colonias con los estudios de Phillips y colaboradores (2013), se obtuvieron los géneros: *Lasiodiplodia* y *Botryosphaeria* pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae*. Además, se obtuvieron los géneros *Colletotrichum* y *Pleurostoma* pertenecientes a las familias *Glomerellaceae* y *Pleurostomataceae*, respectivamente. La caracterización macroscópica y microscópica de cada uno de los aislados se llevó a cabo en medio PDA. Las características de las colonias son las siguientes:

H1Ais1*:* Este aislado pertenece al género *Lasiodiplodia*. La colonia presenta crecimiento inicial de micelio algodonoso blanco que con el paso del tiempo se torna de color gris a negro con una formación de picnidios en un tiempo aproximado de

cuatro semanas. Los conidios se forman dentro de un picnidio con paráfisis, presenta conidios de 22-25 µm de largo y 10-18 µm de ancho hialinos aseptados cuando están inmaduros y color marrón septados con estrías longitudinales cuando están maduros (Figura 3) (Phillips *et al.,* 2013).

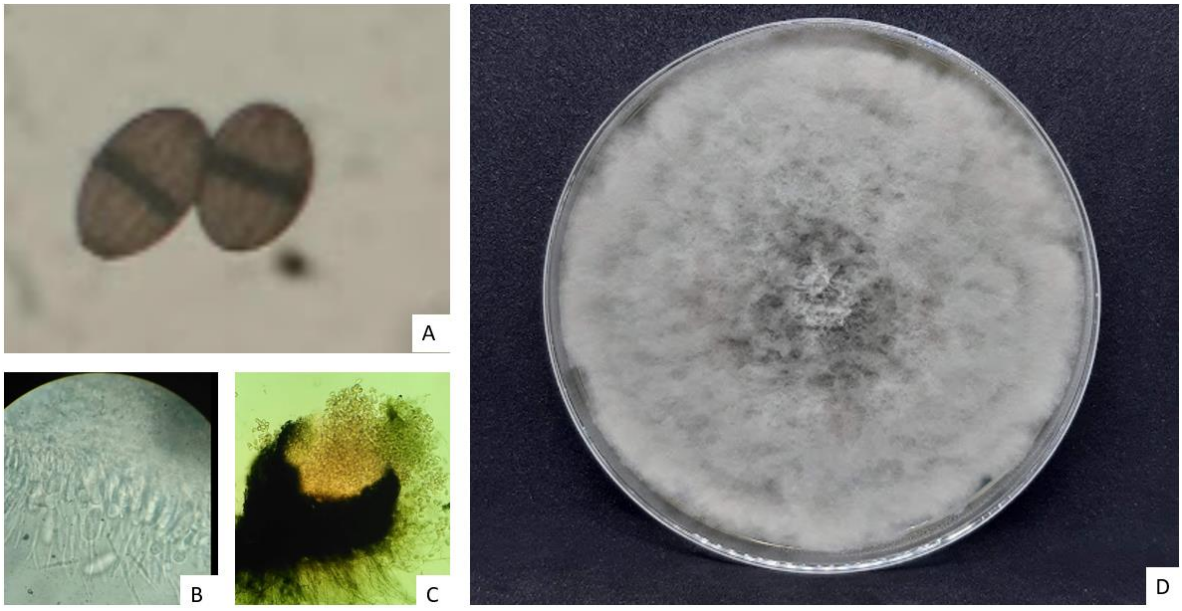

Figura 3. Caracterización macroscópica y microscópica de H1Ais1. A) Conidios maduros color marrón septados con estrías longitudinales. B) Capa conidiógena con paráfisis. C) Conidios inmaduros formados dentro del picnidio. D) Colonia en medio PDA a los cuatro días.

H1Ais2, H3Ais2, H3Ais3B, H3Ais3N, H3Ais4, H3Ais5, H4Ais1, H4Ais2, H5Ais1 y H5Ais2*:* Estos aislados pertenecen al género *Botryosphaeria.* La colonia presenta crecimiento de micelio aéreo algodonoso blanco que se torna a color gris claro y en algunos de los aislados a gris oscuro al paso de siete días; la formación de picnidios se da en un tiempo mayor a cuatro semanas. Los conidios son hialinos con pared delgada y se forman en un picnidio, en ocasiones se tornan de color marrón, los conidios son de 22 x 5 µm, las características generales macroscópicas y

microscópicas se muestran en la Figura 4, mientras que en la Figura 5 se muestran las colonias de cada uno de los aislados (Phillips *et al.,* 2013).

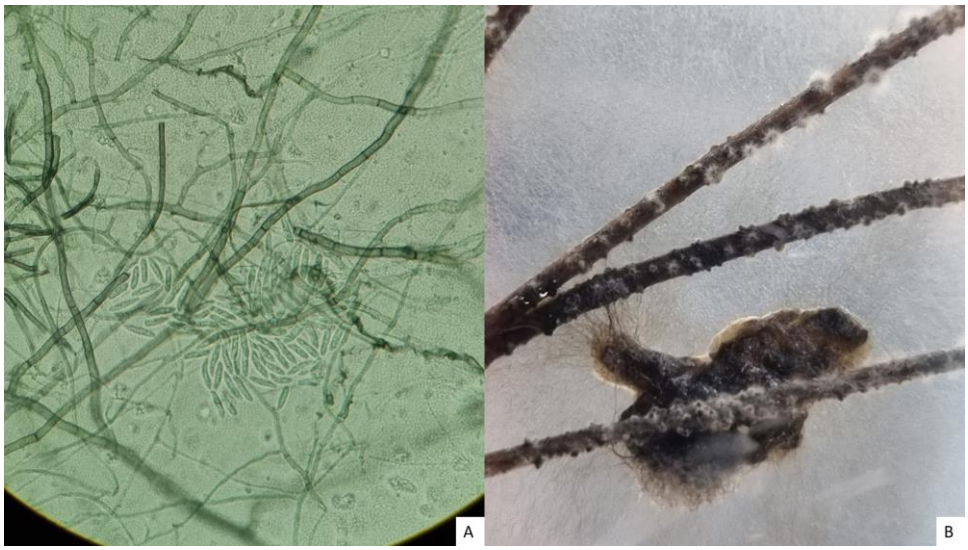

Figura 4. Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados H1Ais2, H3Ais2, H3Ais3B, H3Ais3N, H3Ais4, H3Ais5, H4Ais1, H4Ais2, H5Ais1 y H5Ais2. A) Micelio septado y conidios hialinos aseptados. B) Picnidios en acículas de pino.

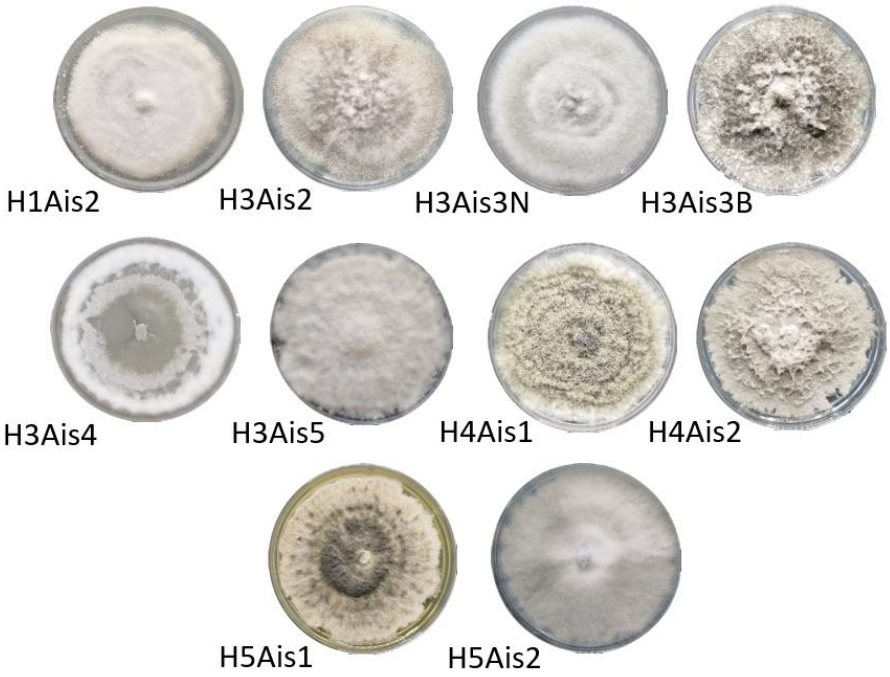

Figura 5. Colonias en medio PDA de aislados del género *Botryosphaeria* obtenidos a partir de ramas de aguacate con síntomas de muerte regresiva.

H2Ais1 y H4Ais3: Estos aislados pertenecen al género *Pleurostoma* spp. Las colonias en medio de cultivo PDA presentan un crecimiento lento de micelio plano y extendido con una textura aterciopelada, con el paso de tiempo presenta crecimiento de micelio aéreo algodonoso de tonalidad crema-café. Las características microscópicas son: conidios de 5.5 x 2.5 µm globulosos con pared delgada y micelio ramificado (Figura 6) (Carlucci *et al.,* 2015; Lawrence *et al.,* 2021).

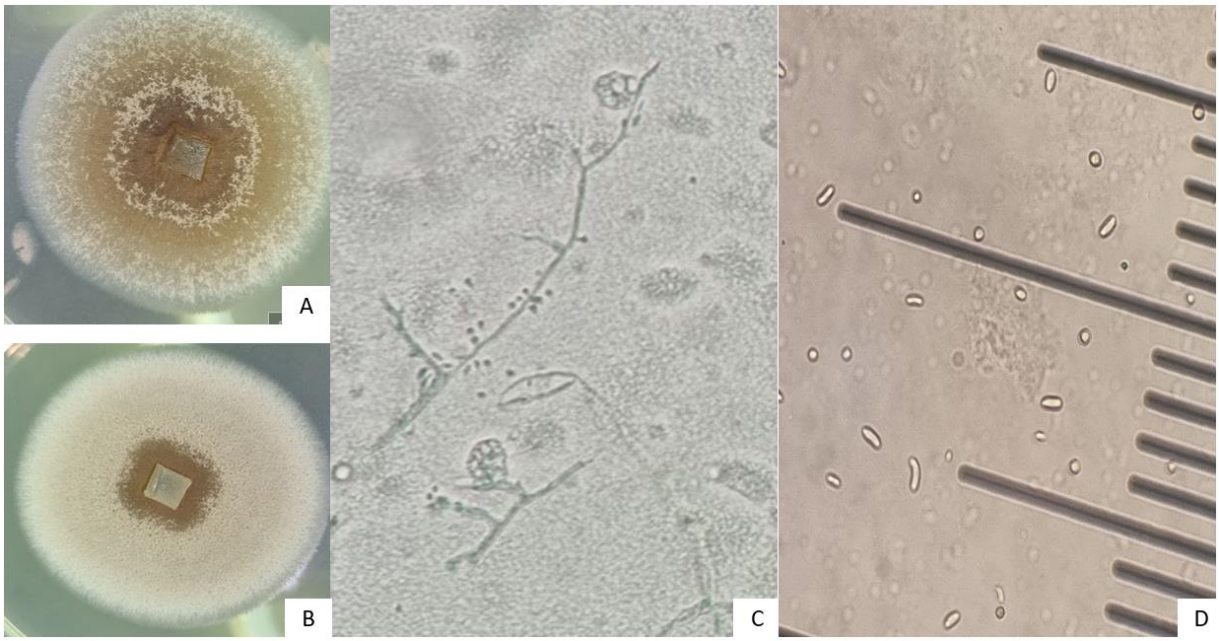

Figura 6. Caracterización macroscópica y microscópica de aislados del género *Pleurostoma*. A) Colonia de 15 días del aislado H4Ais3. B) Colonia de 15 días del aislado H2Ais1. C) Micelio ramificado. D) Conidio hialino globuloso.

H3Ais1*:* Este aislado pertenece al género *Colletotrichum* spp*.* Presenta crecimiento de micelio abundante blanco, por la parte inferior de la caja Petri presenta una coloración amarillo-anaranjada. Los conidios son hialinos aseptados de 13 x 7 µm. Las características macroscópicas y microscópicas se muestran en la Figura 7.

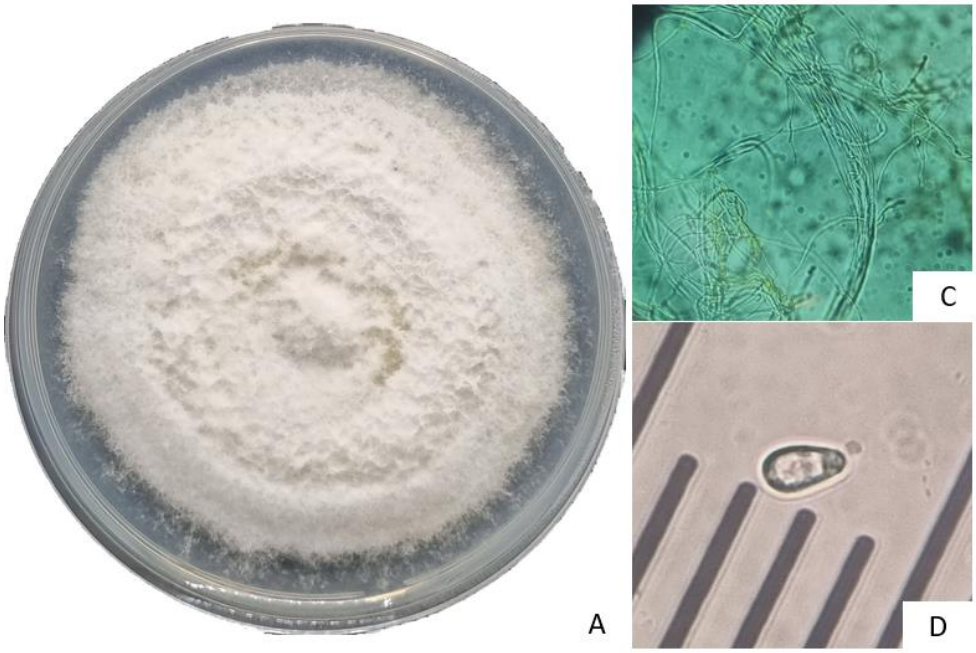

Figura 7. Caracterización macroscópica y microscópica del aislado H3Ais1. A) Colonia de 15 días del aislado del género *Colletotrichum.* B) Micelio hialino teñido con azul de lactofenol. C) Conidio hialino globuloso.

4.4. Pruebas de patogenicidad y características de los re-aislados

Los 14 aislados provocaron daños con diferente patogenicidad en las ramas inoculadas. A partir del tejido infectado se realizó el re-aislamiento del patógeno en medio PDA a los 14 días de la inoculación para comprobar los postulados de Koch (Agrios, 2005). Una vez obtenidos los resultados de la caracterización morfológica y molecular, de acuerdo con la comparación de secuencias con la base de datos del NCBI los aislados se agruparon en cuatro géneros: *Lasiodiplodia, Botryosphaeria, Colletotrichum y Pleurostoma*.

4.4.1 Pruebas de patogenicidad de aislados de géneros de la familia *Botryosphaeriaceae*

4.4.1.1. Aislados de *Lasiodiplodia* spp.

H1Ais1. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas, el re-aislamiento del patógeno se realizó a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento rápido de micelio aéreo algodonoso color blanco que al paso de siete días se tornó de color gris oscuro a negro (Figura 8B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días de la inoculación se observó una coloración marrón-rojiza alrededor de la herida (Figura 8C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 8D).

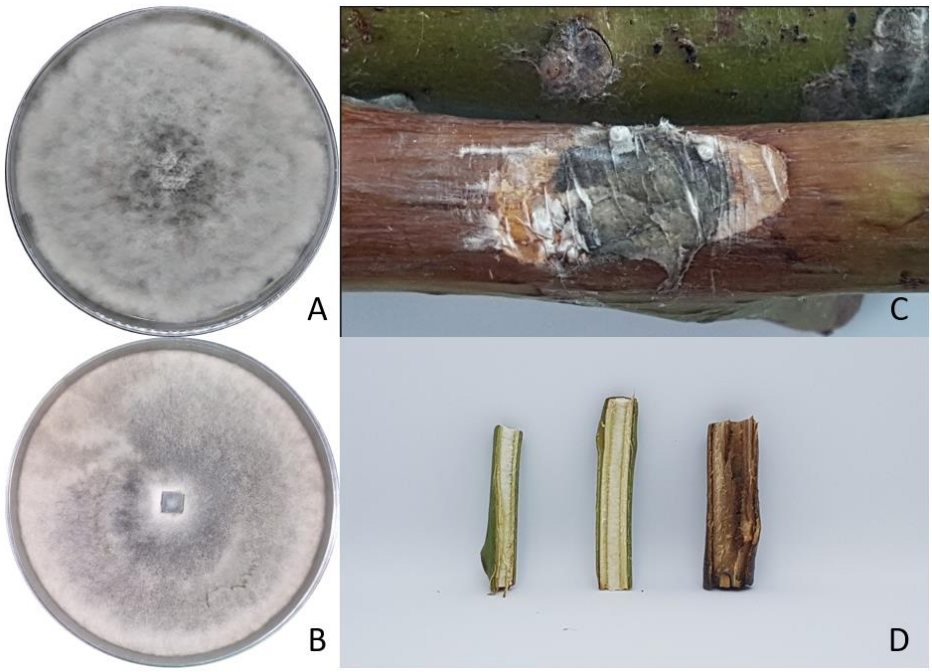

Figura 8. Pruebas de patogenicidad del aislado H1Ais1. A) Colonia del aislado original a los cuatro días. B) Colonia del re-aislado a los cuatro días. C) Síntomas en la rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de ramas testigo.

4.4.1.2. Aislados de *Botryosphaeria* spp.

H1Ais2. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas, en las ramas más delgadas se presentó mayor patogenicidad, en ramas con mayor diámetro el área del tejido necrosado fue menor. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento rápido de micelio aéreo algodonoso de color blanco que se tornó de color gris claro al paso de siete días (Figura 9B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días se observó un ligero hundimiento en la zona de la inoculación acompañado de manchas color marrón alrededor de la herida (Figura 9C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 9D).

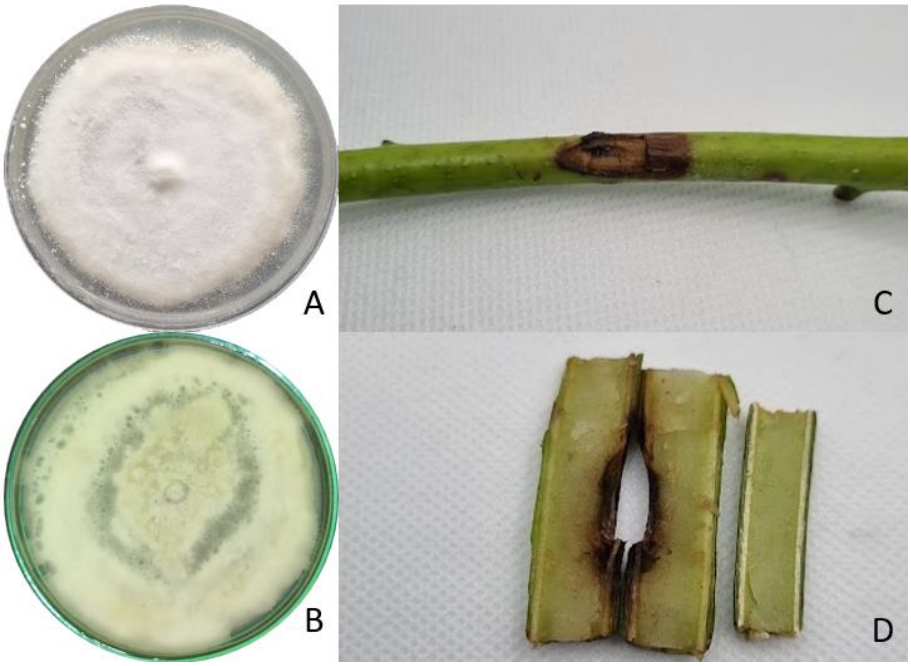

Figura 9. Pruebas de patogenicidad del aislado H1Ais2. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H3Ais2. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento rápido de micelio aéreo blanco poco abundante en la periferia de la colonia, en la zona central se visualizó más micelio aéreo, al paso de 7 días se tornó de color gris con una producción de picnidios en un tiempo aproximado de cuatro semanas (Figura 10B). En la primera evaluación a los siete días se observó el crecimiento micelial alrededor de la inoculación acompañado de manchas color marrón (Figura 10C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días en la Figura 10D.

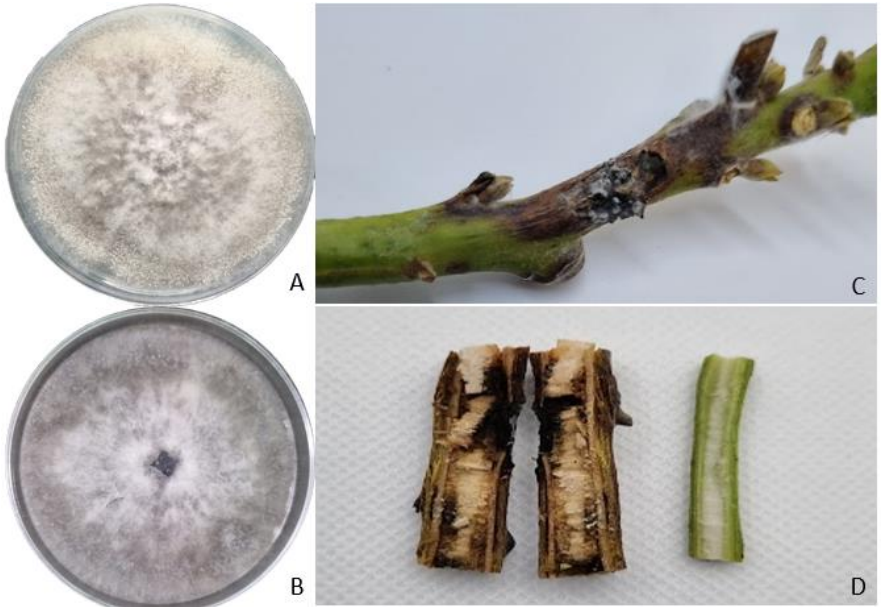

Figura 10. Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais2. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación; D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H3Ais3B. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas, en las ramas más delgadas se presentó mayor patogenicidad, en ramas con mayor diámetro el área del tejido dañado fue menor. Se obtuvo el re-aislamiento

del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento de micelio blanco plano y extendido en la periferia de la colonia, en la parte central de la colonia se observó crecimiento de micelio aéreo blanco, al paso de cinco días se tornó de color gris con presencia de micelio aéreo blanco, al reverso de la placa se observa una coloración gris oscuro a negro (Figura 11B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días se observó un ligero hundimiento en la zona de la inoculación acompañado de crecimiento micelial blanco (Figura 11C). El tejido infectado se observa en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 11D).

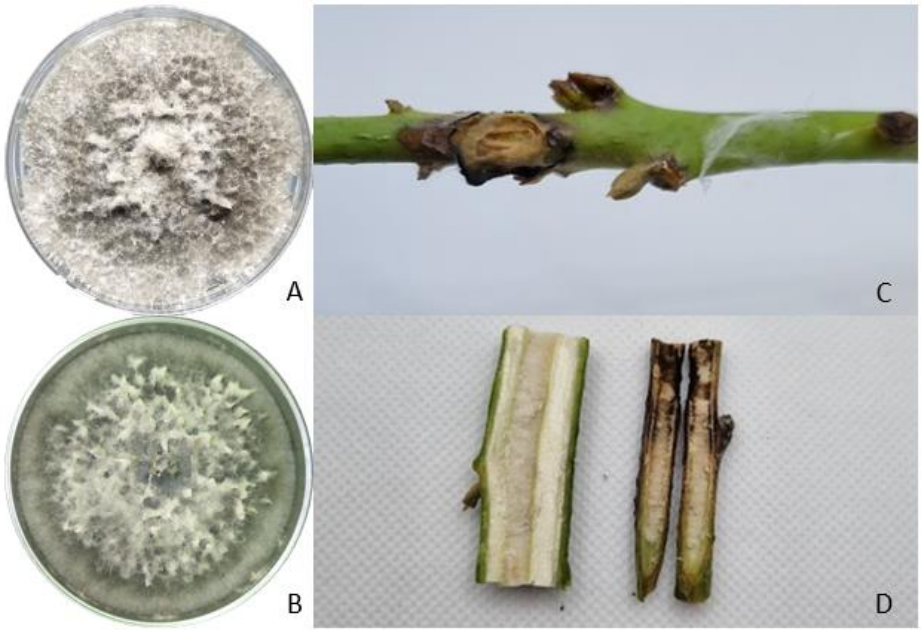

Figura 11. Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais3B. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H3Ais3N. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en dos de las tres ramas inoculadas. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento de micelio blanco elevado y limitado, al

paso de 10 días se tornó a una coloración gris claro con presencia de micelio algodonoso en la zona central de la colonia (Figura 12B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días de la inoculación se observaron manchas color marrón acompañadas de crecimiento de micelio blanco en la zona de la inoculación (Figura 12C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 12D).

Figura 12. Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais3N. A) Colonia del aislado original a los 10 días. B) Colonia del re-aislado a los 10 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H3Ais4. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en dos de las tres ramas inoculadas. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento de micelio plano y extendido en la parte central de la colonia, en la periferia se observó la presencia de micelio abundante algodonoso grisáceo a diferencia de la colonia original donde se mantuvo de color blanco (Figura 13B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días se

observó un ligero hundimiento en la zona central de la inoculación (Figura 13C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 13D).

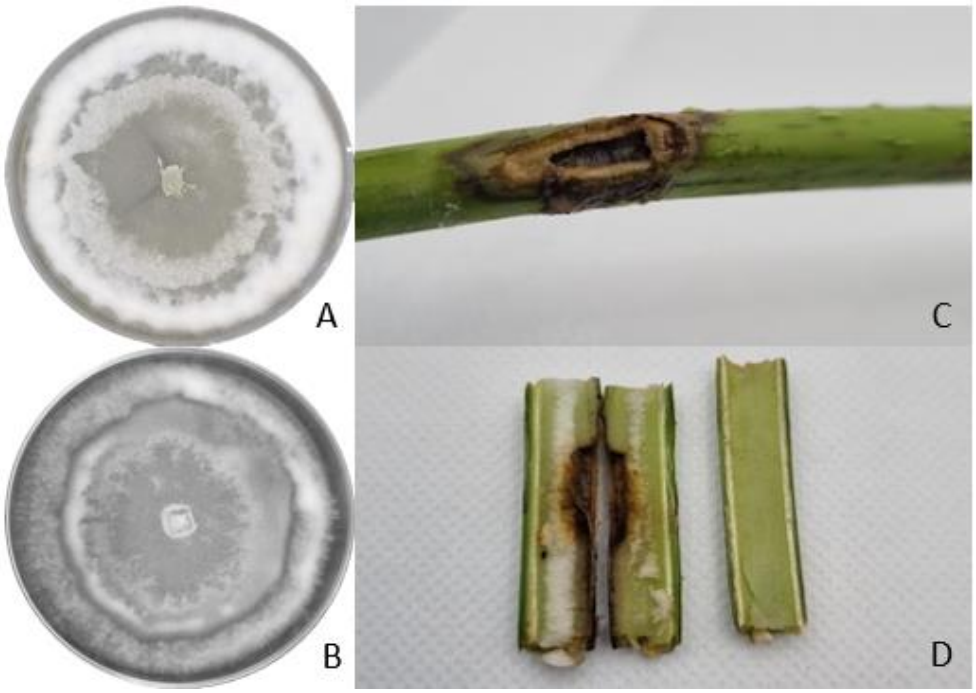

Figura 13. Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais4. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H3Ais5. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento rápido de micelio elevado y limitado blanco, al paso de siete días se tornó de color gris oscuro en la zona central de la colonia y gris claro en la periferia de la colonia a diferencia del aislado original que se mantuvo de color blanco con una coloración grisácea al reverso de la caja Petri (Figura 14A-B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días de la inoculación los daños

no fueron evidentes (Figura 14C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 14D).

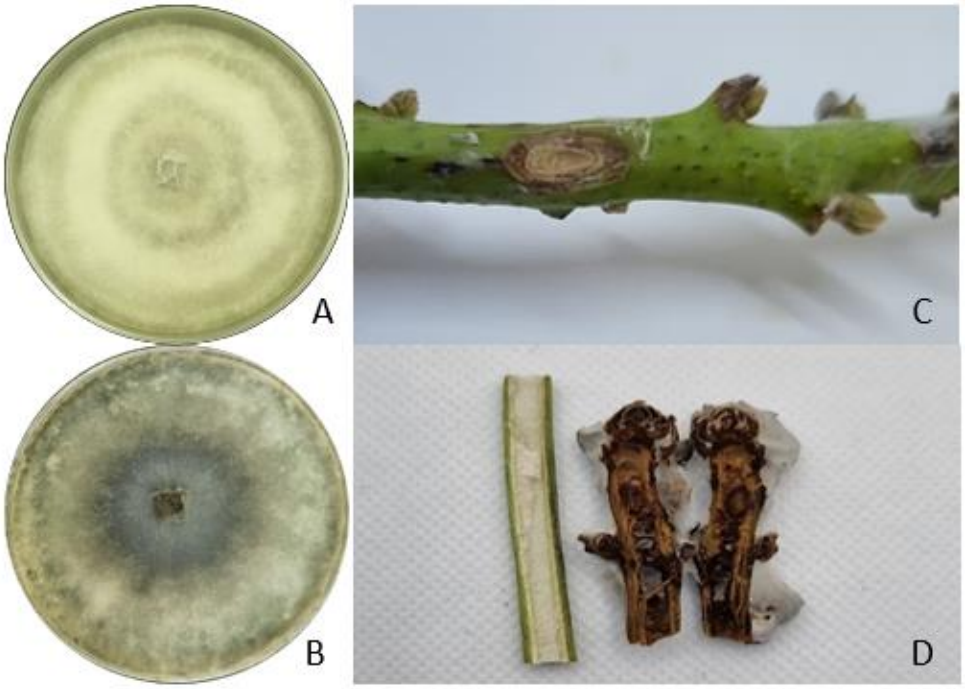

Figura 14. Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais5. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H4Ais1. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en dos de las tres ramas inoculadas. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento rápido de micelio aéreo algodonoso blanco que al paso de 10 días se tornó a un tono gris claro (Figura 15B). En la evaluación de los síntomas a los siete días se observó una coloración amarillo oscuro en la zona de la inoculación (Figura 15C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 15D), en el tejido central se puede observar una coloración crema-amarilla con la presencia de puntos marrón claro.

Figura 15. Pruebas de patogenicidad del aislado H4Ais1. A) Colonia del aislado original a los 10 días. B) Colonia del re-aislado a los 10 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H4Ais2. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas, en las ramas más delgadas se presentó mayor patogenicidad, en ramas con mayor diámetro el área del tejido dañado fue menor. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento de micelio aéreo blanco, al paso de siete días se tornó de un color gris claro, en la parte central de la colonia se presentó poco crecimiento de micelio aéreo blanco en comparación con la colonia del aislado original (Figura 16A-B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días se observaron manchas color marrón alrededor de la inoculación (Figura 16C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 16D).

Figura 16. Pruebas de patogenicidad del aislado H4Ais2. A) Colonia del aislado original a los siete días. B) Colonia del re-aislado a los siete días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H5Ais1. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en dos de las tres ramas inoculadas. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno partir del tejido central dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento de micelio blanco elevado y limitado en los primeros cinco días, con el paso del tiempo se tornó de color gris oscuro en la parte central de la colonia mientras que en la periferia de la colonia se mantuvo una coloración blanca (Figura 17B). En la primera evaluación de los síntomas se observó un ligero hundimiento del tejido en la zona de inoculación, así como una pequeña grieta (Figura 17C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 17-D).

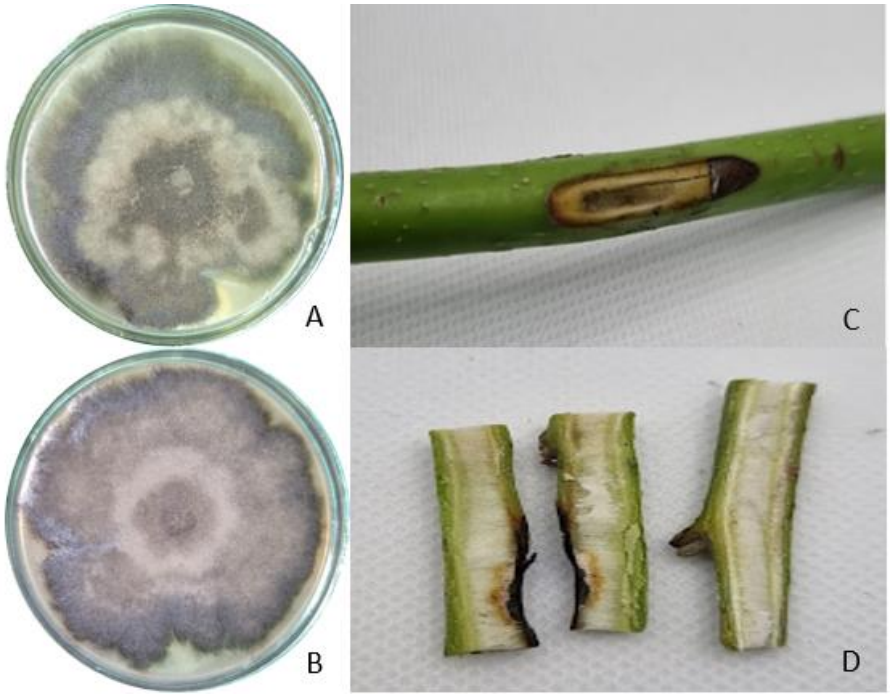

Figura 17. Pruebas de patogenicidad del aislado H5Ais1. A) Colonia del aislado original a los 15 días. B) Colonia del re-aislado a los 15 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H5Ais2. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas, en las ramas más delgadas se presentó mayor patogenicidad. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó un crecimiento de micelio blanco poco abundante, en la parte central de la colonia se presentó coloración de micelio gris oscuro (Figura 18B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días se observó una coloración marrón alrededor de la herida donde fue inoculado el patógeno (Figura 18C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 18D).

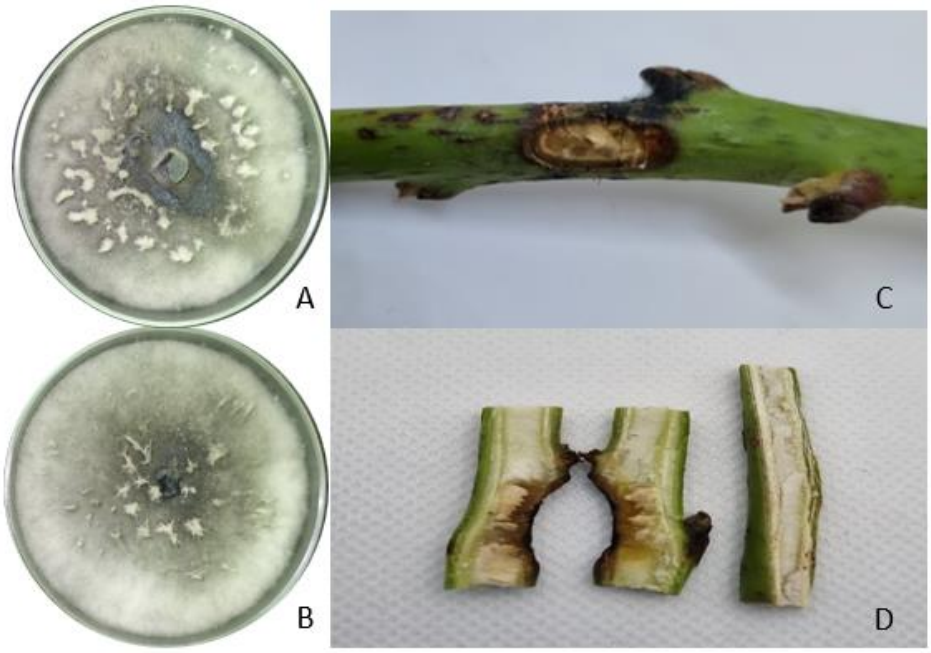

Figura 18. Pruebas de patogenicidad del aislado H5Ais2. A) Colonia del aislado original a los 10 días. B) Colonia del re-aislado a los 10 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

De acuerdo con la caracterización morfológica se obtuvieron 10 aislados pertenecientes al género *Botryosphaeria* y un aislado al género *Lasiodiplodia.* El género *Botryosphaeria* ha sido asociado a gomosis, cancros y muerte regresiva en diferentes hospederos como vid (Amponsah *et al*., 2012), manzano (Delgado-Cerrone *et al*., 2016) y durazno (Wang *et al.,* 2011). En Chile, Valencia y colaboradores (2019) identificaron ocho especies de la familia *Botryosphaeriaceae* como causantes de cancros de ramas y muerte regresiva de árboles de aguacate 'Hass'. Las especies fueron identificadas como *Diplodia mutila, D. pseudoseriata, D. seriata, Dothiorella iberica, Lasiodiplodia theobromae, Neofusicoccum australe, N. nonquaesitum* y *N. parvum.*

Ludwing y colaboradores (2022) demostraron que especies de la familia *Botryosphaeriaceae* tienen diferentes mecanismos de penetración, en árboles de

aguacate pudieron penetrar a través de estomas y lenticelas. Los resultados reportados por los autores generaron más información sobre los mecanismos de penetración de especies de esta familia en el cultivo de aguacate.

Coutinho y colaboradores (2017) mencionan que la infección provocada por el género *Lasiodiplodia* es caracterizada por presentar síntomas como lesiones necróticas, cancros y muerte regresiva, estos síntomas conducen a la muerte de la planta. Por otro lado, el estudio realizado por Arjona-Girona y colaboradores (2019) mostró diversidad y alta incidencia de aislados de hongos asociados a la muerte regresiva de árboles de aguacate en huertos comerciales al sur de España.

4.4.2. Pruebas de patogenicidad de *Pleurostoma* spp.

H2Ais1. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento lento de micelio, con textura aterciopelada color café claro, al paso de cuatro semanas se tornó de color marrón oscuro (Figura 19B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días se observó un ligero hundimiento del tejido central en la zona de la inoculación y manchas marones alrededor de la herida (Figura 19C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 19D).

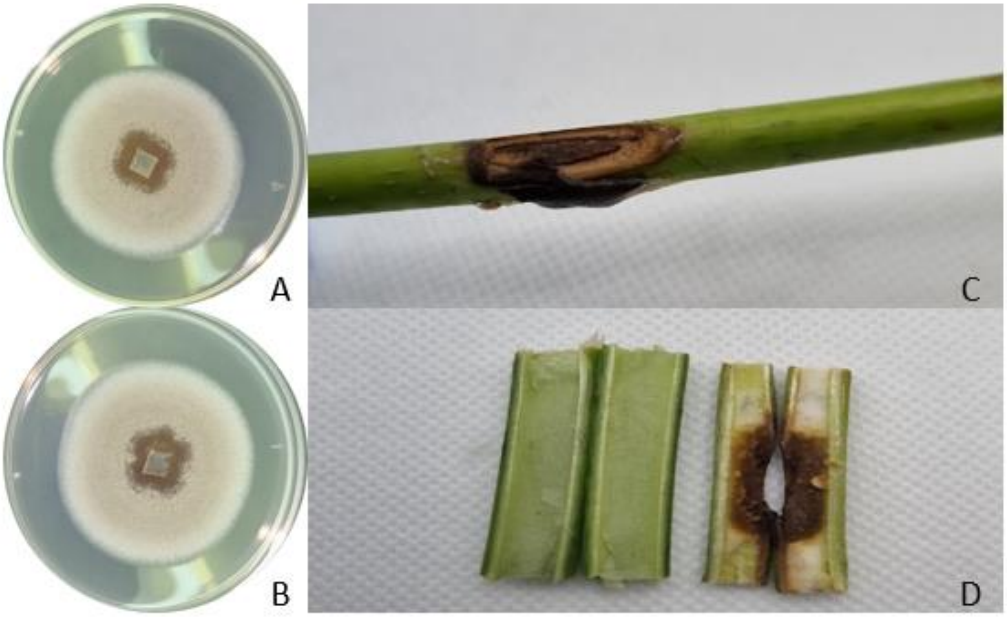

Figura 19. Pruebas de patogenicidad del aislado H2Ais1. A) Colonia del aislado original a los 15 días. B) Colonia del re-aislado a los 15 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

H4Ais3. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó crecimiento lento de micelio blanco plano y extendido con textura aterciopelada, pasando de una coloración crema a café claro manteniendo el color blanco en la periferia de la colonia (Figura 20B). En la primera evaluación de los síntomas a los siete días se observó un ligero hundimiento del tejido central en la zona de la inoculación y manchas marones alrededor de la herida (Figura 20C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 20D).

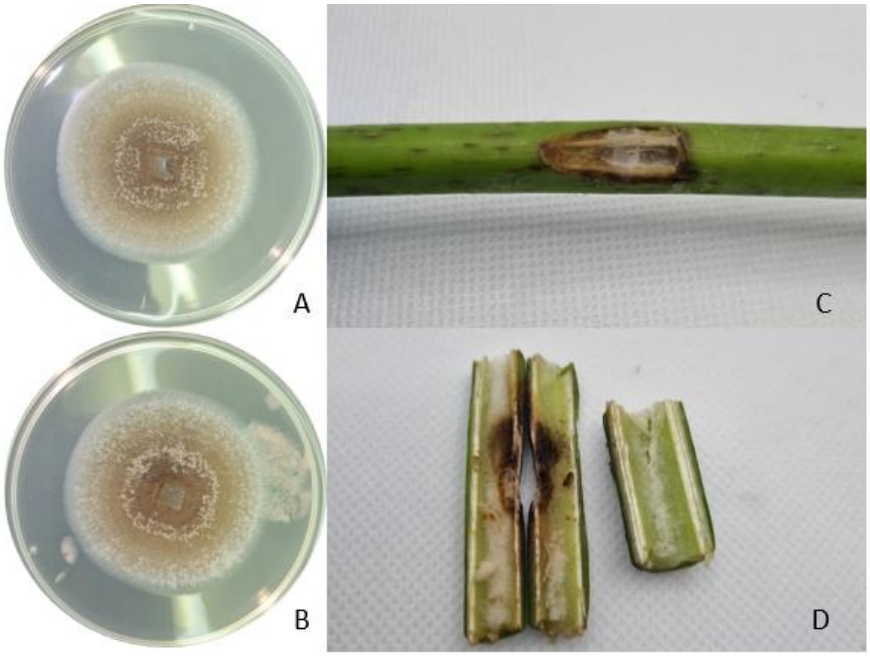

Figura 20. Pruebas de patogenicidad del aislado H4Ais3. A) Colonia del aislado original a los 15 días. B) Colonia del re-aislado a los 15 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

Lawrence y colaboradores (2021) realizaron el primer estudio de identificación, caracterización y pruebas de patogenicidad de *Pleurostoma richardsiae* recuperado de olivos con síntomas de muerte regresiva; los síntomas provocados por esta especie del género *Pleurostoma* son la presencia de ramas muertas y necrosis vascular en corte longitudinal de ramas y troncos que con el tiempo restringen el movimiento del agua por lo que conduce a la muerte de la planta.

Los síntomas observados en las evaluaciones realizadas a los siete y 14 días de la inoculación de los aislados pertenecientes al género *Pleurostoma* concuerdan con los síntomas reportados en los estudios de Pintos y colaboradores (2016) donde mencionan que los síntomas en vid provocados por la infección provocada por hongos de este género incluyen manchas oscuras alrededor del tronco y manchas color

marrón en el tejido central de la rama. A la fecha no existen reportes de este género como causante de muerte regresiva en el cultivo de aguacate.

4.4.3. Pruebas de patogenicidad de *Colletotrichum* spp.

H3Ais1. Los síntomas producidos por este aislado se presentaron en las tres ramas inoculadas, en las ramas más delgadas se presentó mayor patogenicidad, en ramas con mayor diámetro el área del tejido necrosado fue menor. Se obtuvo el re-aislamiento del patógeno a partir del tejido dañado. La colonia del re-aislado presentó un crecimiento rápido de micelio aéreo algodonoso blanco abundante, al reverso de la caja Petri presentó coloración amarillo-anaranjado. En la primera evaluación de los síntomas a los siete días se observó un ligero hundimiento de la zona de la inoculación acompañado de manchas color marrón alrededor de la herida (Figura 21C). El tejido infectado se puede observar en corte longitudinal de la rama inoculada a los 14 días (Figura 21D).

Ramos y colaboradores (2016) mencionan que la especie *C. gloeosporioides* causó muerte regresiva y necrosis en ramas de mandarino y naranjo dulce, estos síntomas concuerdan con los síntomas observados en las ramas en las pruebas de patogenicidad realizadas. Arjona Girona y colaboradores (2019) obtuvieron 68 aislados de ramas con síntomas de muerte regresiva en huertos de aguacate en el sur de España los cuales fueron identificados como pertenecientes de los géneros *Lasiodiplodia, Neofusicoccum* y *Colletotrichum* con diferentes proporciones, el 18% de los aislados pertenecen a *Colletotrichum gloeosporioides* obtenido de las localidades de Benamocarra y Vélez Málaga con una incidencia del 16.2-17.6%.

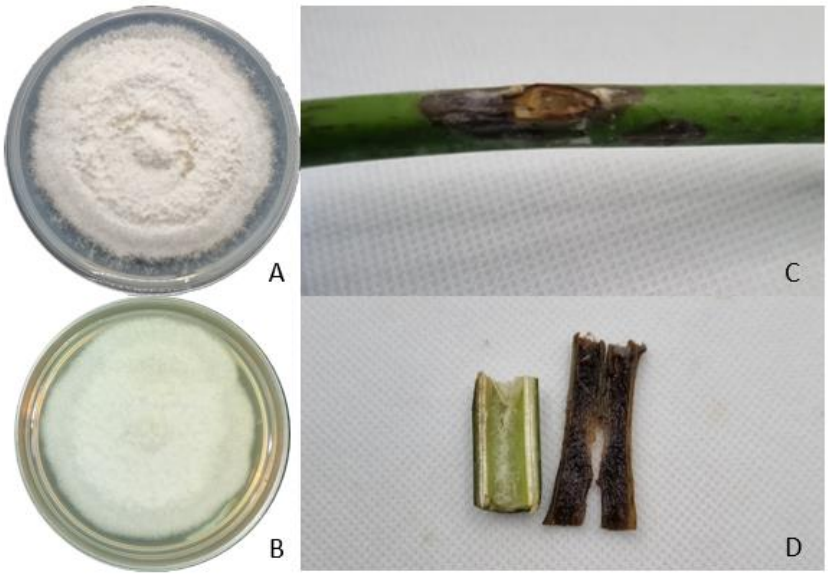

Figura 21. Pruebas de patogenicidad del aislado H3Ais1. A) Colonia del aislado original a los 15 días. B) Colonia del re-aislado a los 15 días. C) Rama a los siete días de la inoculación. D) Corte longitudinal de rama a los 14 días de la inoculación y corte longitudinal de rama testigo.

4.5. Identificación molecular

En la extracción de ADN total realizada utilizando lo propuesto por Lee y Taylor (1990) con las modificaciones antes descritas se obtuvieron concentraciones de 30-400 ng/µL. Las regiones genéticas amplificadas por género para la identificación molecular de los aislados de los hongos asociados a la muerte regresiva de aguacate se encuentran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Regiones genéticas amplificadas para la identificación molecular de cada género de los hongos aislados de ramas de aguacate de huertas de Sabinas Hidalgo, N.L.

Género	Regiones amplificadas
Lasiodiplodia	ITS, Tef1-α, Tub2, SSU, LSU y RPB2
Botryosphaeria	ITS, Tef1-α y Tub2
Pleurostoma	ITS, Tef1-α, Tub2 y SSU
Colletotrichum	ITS, Tef1-α y Tub2

La comparación de las secuencias obtenidas de las regiones amplificadas para cada uno de los aislados tuvo homología del 99-100% con especies del género *Lasiodiplodia, Botryosphaeria, Pleurostoma y Colletotrichum.*

Las especies que se obtuvieron con mayor frecuencia en cada una de las regiones amplificadas para cada aislado se muestran en el Cuadro 6, se continua con la realización de los análisis filogenéticos para la determinación de la especie para cada aislado.

Cuadro 6. Especies obtenidas del análisis de secuencias de las regiones amplificadas con el Software Blastn para cada uno de los aislados.

Aislado	Género	Especie
H1Ais1	*Lasiodiplodia*	*L. citricola, L. theobromae* o *L. parva*
H1Ais2	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H2Ais1	*Pleurostoma*	*P. richardsiae*
H3Ais1	*Colletotrichum*	*C. siamense*
H3Ais2	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H3Ais3B	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H3Ais3N	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H3Ais4	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H3Ais5	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H4Ais1	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H4Ais2	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H4Ais3	*Pleurostoma*	*P. richardsiae*
H5Ais1	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*
H5Ais2	*Botryosphaeria*	*B. dothidea*

En el Cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos de la comparación de secuencias para cada uno de los aislados, así como el número de accesión para cada especie con una homología del 99-100%.

Las especies obtenidas con mayor frecuencia en la comparación de secuencias de cada uno de los géneros de los hongos obtenidos de árboles de aguacate con síntomas de muerte regresiva en el municipio de Sabinas Hidalgo, N.L. fueron:

Lasiodiplodia theobromae, Botryosphaeria dothidea, Colletotrichum siamense y *Pleurostoma richardsiae.* La especie que se presentó con más frecuencia en la identificación molecular de los aislados fue *Botryosphaeria dothidea,* obtenida en las huertas, Rancho Daberat, Los Salinas, Víctor González y Orel Chapa.

Las especies *Lasiodiplodia theobromae* y *Botryosphaeria dothidea* son pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae,* esta familia es considerada de gran importancia por la amenaza que representan para sus hospederos por las enfermedades que ocasionan en los cultivos de importancia agrícola ya que presentan habilidad de pasar de endófito a patógeno (Mondragón-Flores *et al*., 2021).

En Perú, Alama y colaboradores (2006) realizaron el primer reporte de *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal de muerte regresiva y cancros del aguacate, el 80% de los aislados obtenidos pertenecían a *Lasiodiplodia.* Además del cultivo de aguacate, en México *Lasiodiplodia theobromae* ha sido reportado causando muerte regresiva, cancros y gomosis en limón persa en los municipios de Montemorelos y General Terán, Nuevo León y Llera de Canales, Tamaulipas (Polanco *et al.,* 2019), mamey en el municipio de Alpoyeca, Guerrero, siendo el primer reporte que determinó a este patógeno como agente causal (Vásquez-López *et al.,* 2009) y mango en los estados de Colima, Guerrero, Jalisco y Nayarit (Sandoval-Sánchez *et al.,* 2013).

Menge y Ploetz (2003) relacionan a *Botryosphaeria dothidea* con la pudrición de frutos en aguacate, por otro lado, esta especie ha sido reportada causando cancros y muerte regresiva en eucalipto (Smith *et al.,* 1994), olivo (Moral *et al.,* 2017), vid (Phillips, 1998) y blueberry (Choi, 2011). Marsberg y colaboradores (2017) indican que la importancia de *B. dothidea* como patógeno ha sido subestimada, en gran parte por su naturaleza

de endófito, este patógeno en condiciones adversas es capaz de pasar de endófito a patógeno con consecuencias potencialmente graves para los hospederos infectados.

Riolo y colaboradores (2021) identificaron especies del género *Colletotrichum* como agentes causales de la muerte de ramas y brotes de cítricos, los síntomas identificados en el estudio incluyen la aparición de ramas secas, gomosis y defoliación. *Colletotrichum siamense* ha sido asociado a la antracnosis del aguacate en Israel (Sharma *et al.,* 2017), por otro lado, ha sido asociado con la muerte regresiva de puntas en sacha inchi (Wang *et al.,* 2020) y cítricos (Fayyas *et al.,* 2018).

Lawrence y colaboradores (2021) realizaron el primer estudio de identificación, caracterización y pruebas de patogenicidad de *Pleurostoma richardsiae* recuperado de olivos con síntomas de muerte regresiva. Por otro lado, Sohrabi y colaboradores (2021) aislaron a *Pleurostoma richardsiae* de muestras de madera de huertos de almendro, pistacho y nuez que mostraron síntomas externos e internos como amarillamiento, cancros en tronco y ramas y necrosis de la madera, siendo la primera vez que *Pleurostoma richardsiae* es asociado con el amarillamiento, cancros y muerte. Además de *Pleurostoma richardsiae* obtuvieron nueve especies de *Phaeoacremonium,* cuatro especies de *Diatrypaceae,* dos especies de *Eutypella* y 11 especies de la familia *Botryosphaeriaceae* entre la que se encuentran *B. dothidea, L. citricola* y *L. theobromae.*

Cuadro 7. Resultados de la comparación de secuencias obtenidas utilizando el software Blastn.

Aislado	Región	Organismo	Query cover*	Valor E	Identidad máxima	Accesión
H1Ais1	ITS	*Lasiodiplodia citricola*	100%	0	100%	MN880464.1
		Lasiodiplodia theobromae	100%	0	100%	MK530006.1
		Lasiodiplodia parva	100%	0	100%	MZ613157.1
	Tub2	*Lasiodiplodia theobromae*	100%	0	100%	EU254720.1
		Lasiodiplodia citricola	100%	0	100%	KF778904.1
		Lasiodiplodia parva	100%	0	100%	KX227567.1
	Tef1-α	*Lasiodiplodia citricola*	100%	0	100%	MT856966.1
		Lasiodiplodia euphorbiaceicola	100%	0	100%	MW315820.1
		Lasiodiplodia laeliocattleyae	100%	0	100%	MG979508.1
	LSU	*Lasiodiplodia americana*	100%	0	100%	MF410052.0
		Lasiodiplodia theobromae	100%	0	100%	ON685323.1
		Lasiodiplodia parva	100%	0	100%	LN907364.1
	SSU	*Lasiodiplodia krabiensis*	100%	0	100%	MN017924.1
		Lasiodiplodia theobromae	100%	0	100%	MN893998.1
		Lasiodiplodia parva	100%	0	100%	MN493107.1
	RPB2	*Botryosphaeria rhodina*	100%	0	100%	AY550081.1
		Lasiodiplodia citricola	99%	0	100%	MN906303.1
		Lasiodiplodia mexicanensis	100%	0	99%	MW604222.1
H1Ais2	ITS	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MT559099.1
		Botryosphaeria kuwatsukai	100%	0	100%	ON495781.1
		Botryosphaeria fabicerciana	100%	0	100%	MW862141.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MW202404.1
		Botryosphaeria fusispora	97%	0	99%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	JQ512102.1
		Botryosphaeria ensis	100%	0	100%	MT028759.1

*****Porcentaje de cobertura

Cuadro 7. Continuación...

Aislado	Región	Organismo	Query cover*	Valor E	Identidad máxima	Accesión
H2Ais1	ITS	*Pleurostoma richardsiae*	100%	0	100%	MN633946.1
		Pleurostomophora richardsiae	100%	0	100%	KF751176.1
		Phialophora mustea	100%	0	100%	HQ115660.1
	Tub2	*Pleurostoma richardsiae*	100%	0	100%	MT735027.1
	Tef1-α	*Pleurostoma richardsiae*	99%	0	99%	KX036524.1
	SSU	*Pleurostoma richardsiae*	100%	0	100%	MT505715.1
		Pleurostoma ootheca	100%	0	99%	OM017218.1
		Pleurostoma repens	100%	0	99%	MT158371.1
H3Ais1	ITS	*Colletotrichum aenigma*	100%	0	100%	ON492208.1
		Colletotrichum siamense	100%	0	100%	ON368271.1
		Colletotrichum fructicola	100%	0	100%	ON329259.1
	Tub2	*Colletotrichum siamense*	100%	0	100%	MN525901.1
		Colletotrichum viniferum	100%	0	100%	MH113911.1
		Colletotrichum changpingense	100%	0	100%	MZ673952.1
	Tef1-α	*Colletotrichum siamense*	94%	0	100%	KX845557.1
H3Ais2	ITS	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MT367874.1
		Botryosphaeria kuwatsukai	100%	0	100%	ON495781.1
		Botryosphaeria ramosa	100%	0	100%	ON332147.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MW202404.1
		Botryosphaeria fusispora	99%	0	100%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	98%	0	100%	MN025271.1
H3Ais3B	ITS	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MN634017.1
		Botryosphaeria kuwatsukai	100%	0	100%	ON495781.1
		Botryosphaeria fabicerciana	100%	0	100%	MW862141.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MW202404.1
		Botryosphaeria fusispora	100%	0	100%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria wangensis*	100%	0	100%	MT028759.1
		Botryosphaeria dothidea	100%	0	100%	MN025271.1

Cuadro 7. Continuación…

Aislado	Región	Organismo	Query cover*	Valor E	Identidad máxima	Accesión
H3Ais3N	ITS	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MN634017.1
		Botryosphaeria kuwatsukai	100%	0	100%	ON495781.1
		Botryosphaeria fabicerciana	100%	0	100%	MW862141.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	99%	0	100%	MN370930.1
		Botryosphaeria fusispora	99%	0	100%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MK722179.1
		Botryosphaeria wangensis	100%	0	100%	MT028759.1
H3Ais4	ITS	*Dichomera saubinetii*	100%	0	100%	KF766153.1
		Botryosphaeria dothidea	100%	0	100%	MT177925.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MH392258.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MN633970.1
		Botryosphaeria sinensis	100%	0	100%	MH392264.1
H3Ais5	ITS	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MN634016.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MW202404.1
		Botryosphaeria fusispora	100%	0	99%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	98%	0	100%	MN025271.1
H4Ais1	ITS	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MN634015.1
		Botryosphaeria ramosa	100%	0	100%	ON332147.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MW202404.1
		Botryosphaeria fusispora	100%	0	100%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MK722179.1
		Botryosphaeris wangensis	100%	0	100%	MT028759.1

Cuadro 7. Continuación…

Aislado	Región	Organismo	Query cover*	Valor E	Identidad máxima	Accesión
H4Ais2	ITS	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	ON740662.1
		Botryosphaeria kuwatsukai	100%	0	100%	MN918797.1
		Neofusicoccum mediterraneum	100%	0	100%	FJ755232.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MN370930.1
		Botryosphaeria fusispora	100%	0	100%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MH392261.1
		Botryosphaeris wangensis	100%	0	100%	MT028759.1
H4Ais3	ITS	*Pleurostoma richardsiae*	100%	0	100%	MK647984.1
	Tub2	*Pleurostoma richardsiae*	100%	0	100%	MT735027.1
	Tef1-α	*Pleurostoma richardsiae*	99%	0	100%	KX036524.1
	SSU	*Pleurostoma richardsiae*	100%	0	100%	MT505714.1
		Pleurostoma ootheca	100%	0	99%	MT158369.1
		Pleurostoma ochraceum	100%	0	99%	NG062856.1
H5Ais1	ITS	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MN634011.1
		Botryosphaeria kuwatsukai	100%	0	100%	ON495781.1
		Botryosphaeria ramosa	100%	0	100%	ON332147.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MW202404.1
		Botryosphaeria fusispora	100%	0	100%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MK722179.1
		Botryosphaeris wangensis	100%	0	100%	MT028759.1
H5Ais2	ITS	*Dichomera saubinetii*	100%	0	100%	KF766153.1
		Botryosphaeria dothidea	100%	0	100%	MT177925.1
	Tub2	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	MN370930.1
		Botryosphaeria fusispora	100%	0	100%	MT592469.1
	Tef1-α	*Botryosphaeria dothidea*	100%	0	100%	JQ512102.1
		Botryosphaeris wangensis	100%	0	100%	MT028759.1

4.6. Sensibilidad *in vitro* de los aislados obtenidos a cinco fungicidas de diferentes grupos químicos.

4.6.1. Familia *Botryosphaeriaceae*

4.6.1.1. Aislado de *Lasiodiplodia* spp.

H1Ais1. De acuerdo con los resultado de la identificación molecular, este aislado pertenece a *Lasiodiplodia* spp. (posibles especies: *L. citricola, L. parva* o *L. theobromae*). El análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mostró diferencias altamente significativas (P= 0.001) entre los tratamientos (Anexo 2). Este aislado presentó inhibición del 92-100% en dosis a partir de 1 ppm de tiofanato metílico, 10 ppm de tebuconazol, tiabendazol y propiconazol, y 1000 ppm de hymexazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 8). En la Figura 22 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H1Ais1 a los cuatro días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 8. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H1Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	97.3 A
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 10 ppm	96.9 A
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	94.4 A
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Propiconazol 10 ppm	92.0 A
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Propiconazol 1 ppm	76.3 B
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	76.1 B
Tiofanato metílico 100 ppm	100.0 A	Hymexazol 100 ppm	28.7 C
Tiofanato metílico 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 1 ppm	28.2 C
Tiabendazol 10 ppm	98.4 A	Hymexazol 1 ppm	3.3 D
Hymexazol 1000 ppm	97.8 A	Hymexazol 10 ppm	2.7 D

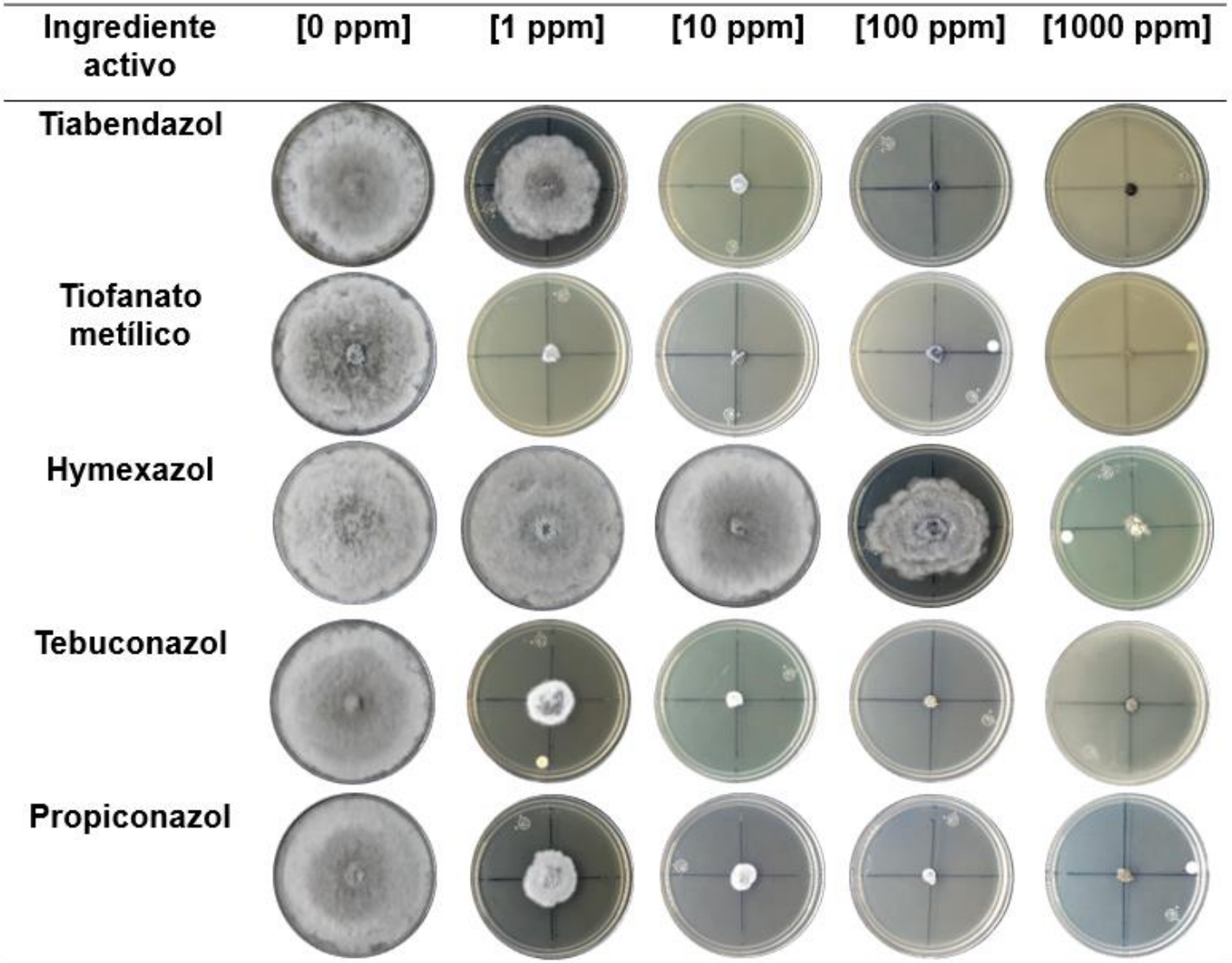

Figura 22. Crecimiento micelial del aislado H1Ais1 a los cuatro días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

4.6.1.2. Aislados de *Botryosphaeria* spp.

En todos los aislados de este género (H1Ais2, H3Ais2, H3Ais3B, H3Ais3N, H3Ais4, H3Ais5, H4Ais1, H4Ais2, H5Ais1 y H5Ais2) el análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mostró diferencias altamente significativas (P= 0.001) (Anexo 3), además se observó que, a mayor concentración de ingrediente activo, la inhibición del crecimiento micelial fue mayor. De acuerdo con los resultados obtenidos de la identificación molecular, todos los aislados pertenecen a la especie *B. dothidea.*

H1Ais2. Este aislado presentó inhibición del 92-100% en dosis de 10, 100 y 1000 ppm de propiconazol, 100 y 1000 ppm de tiabendazol y tebuconazol, y 1000 ppm de hymexazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 9). Por otro lado, los tratamientos de 1 y 10 ppm de hymexazol no presentaron inhibición del crecimiento micelial del patógeno. En la Figura 23 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H1Ais2 a los 10 días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 9. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H1Ais2 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	77.6 DE
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 10 ppm	71.2 EF
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Propiconazol 1 ppm	63.6 FG
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	62.6 FGH
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Hymexazol 100 ppm	56.1 GH
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	53.6 HI
Hymexazol 1000 ppm	92.7 AB	Tiabendazol 1 ppm	45.3 IJ
Propiconazol 10 ppm	92.1 AB	Tiofanato metílico 1 ppm	40.5 J
Tebuconazol 10 ppm	89.7 BC	Hymexazol 1 ppm	0.0 K
Tiofanato metílico 1000 ppm	81.9 CD	Hymexazol 10 ppm	0.0 K

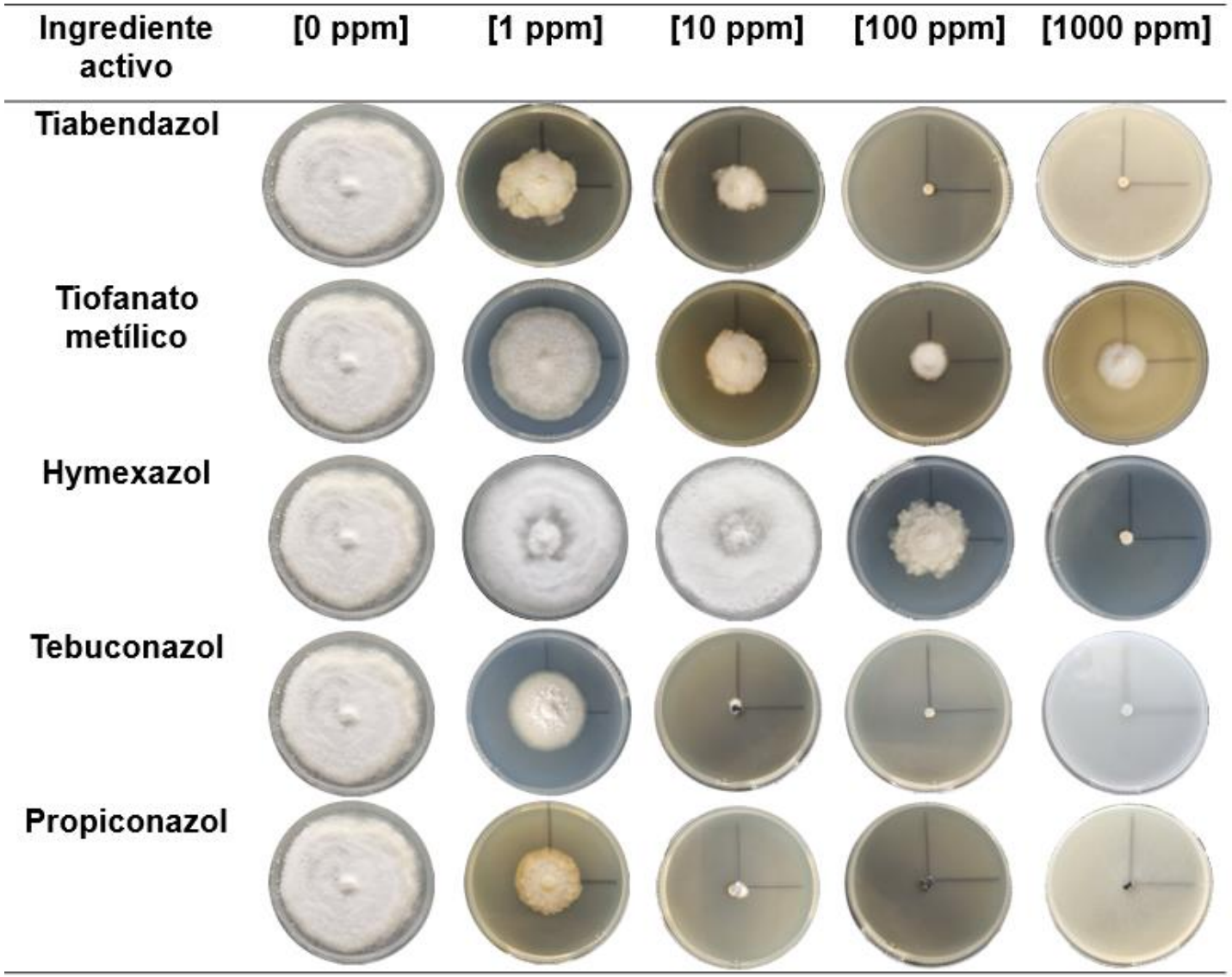

Figura 23. Crecimiento micelial del aislado H1Ais2 a los 10 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H3Ais2. Este aislado presentó inhibición del 92-100% en dosis de 10, 100 y 1000 ppm de tebuconazol, y 100 y 1000 ppm de tiabendazol y propiconazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 10). Por otro lado, los tratamientos de 1, 10 y 100 ppm de hymexazol y 1 ppm de propiconazol y tiabendazol no presentaron inhibición del crecimiento micelial del patógeno. En la Figura 24 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H3Ais2 a los ocho días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 10. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais2 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	71.3 DE
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	63.1 EF
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	57.4 FG
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	52.2 G
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tiabendazol 10 ppm	49.6 G
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Hymexazol 1 ppm	0.0 H
Tebuconazol 10 ppm	92.0 AB	Hymexazol 10 ppm	0.0 H
Hymexazol 1000 ppm	87.8 BC	Hymexazol 100 ppm	0.0 H
Propiconazol 10 ppm	85.9 BC	Propiconazol 1 ppm	0.0 H
Tiofanato metílico 1000 ppm	77.6 CD	Tiabendazol 1 ppm	0.0 H

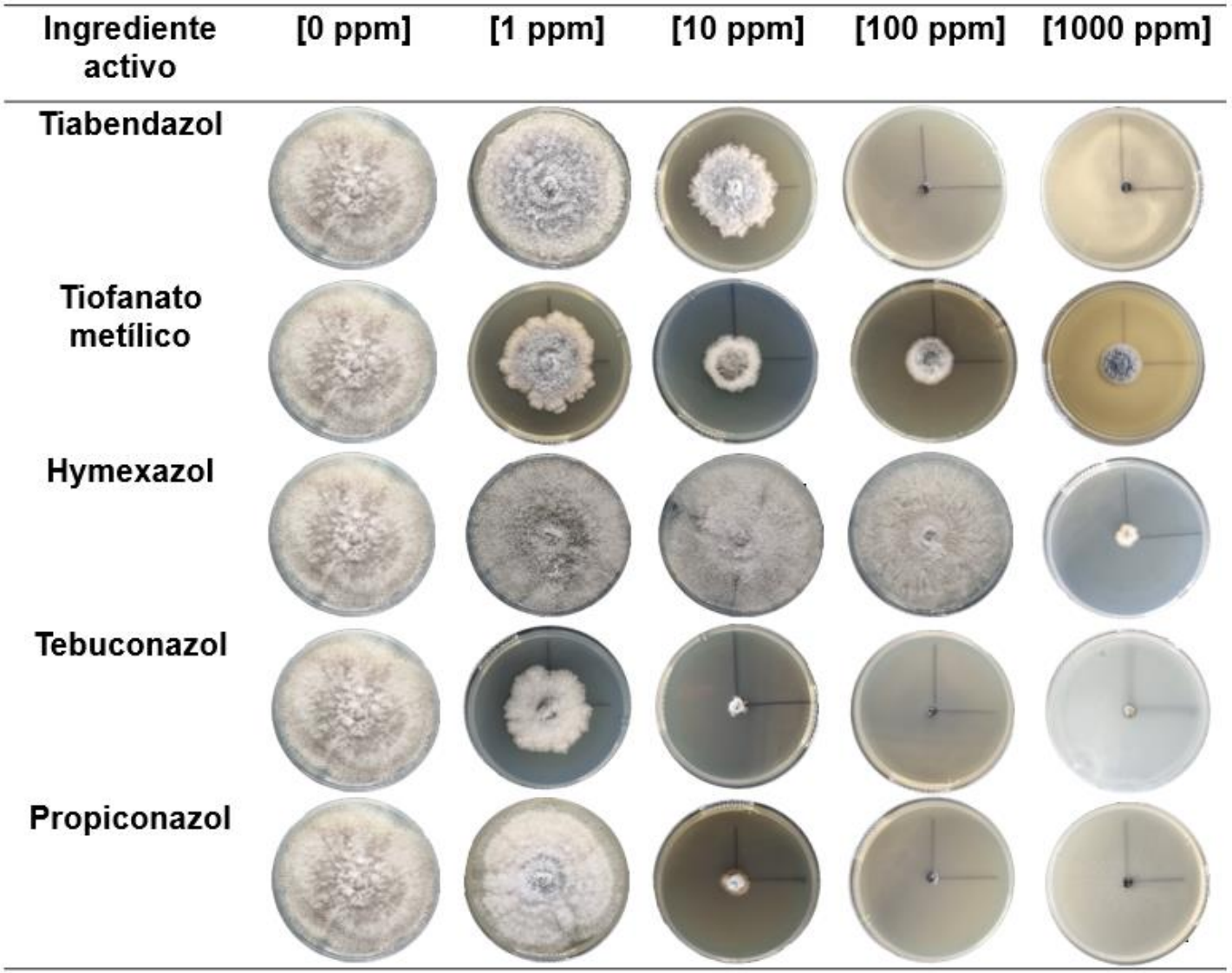

Figura 24. Crecimiento micelial del aislado H3Ais2 a los ocho días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H3Ais3B. Presentó inhibición del 100% en dosis de 100 y 1000 ppm de propiconazol, tiabendazol y tebuconazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 11). Por otro lado, los tratamientos de 1, 10 y 100 ppm de hymexazol y 1 ppm de propiconazol no presentaron inhibición de crecimiento micelial del patógeno. En la Figura 25 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H3Ais3B a los siete días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 11. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais3B por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	77.3 C
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	70.3 D
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Tiabendazol 10 ppm	55.9 E
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	52.6 E
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	40.7 F
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 1 ppm	6.9 G
Tebuconazol 10 ppm	88.8 B	Hymexazol 1 ppm	0.0 H
Hymexazol 1000 ppm	88.4 B	Hymexazol 10 ppm	0.0 H
Propiconazol 10 ppm	88.0 B	Hymexazol 100 ppm	0.0 H
Tiofanato metílico 1000 ppm	81.0 C	Propiconazol 1 ppm	0.0 H

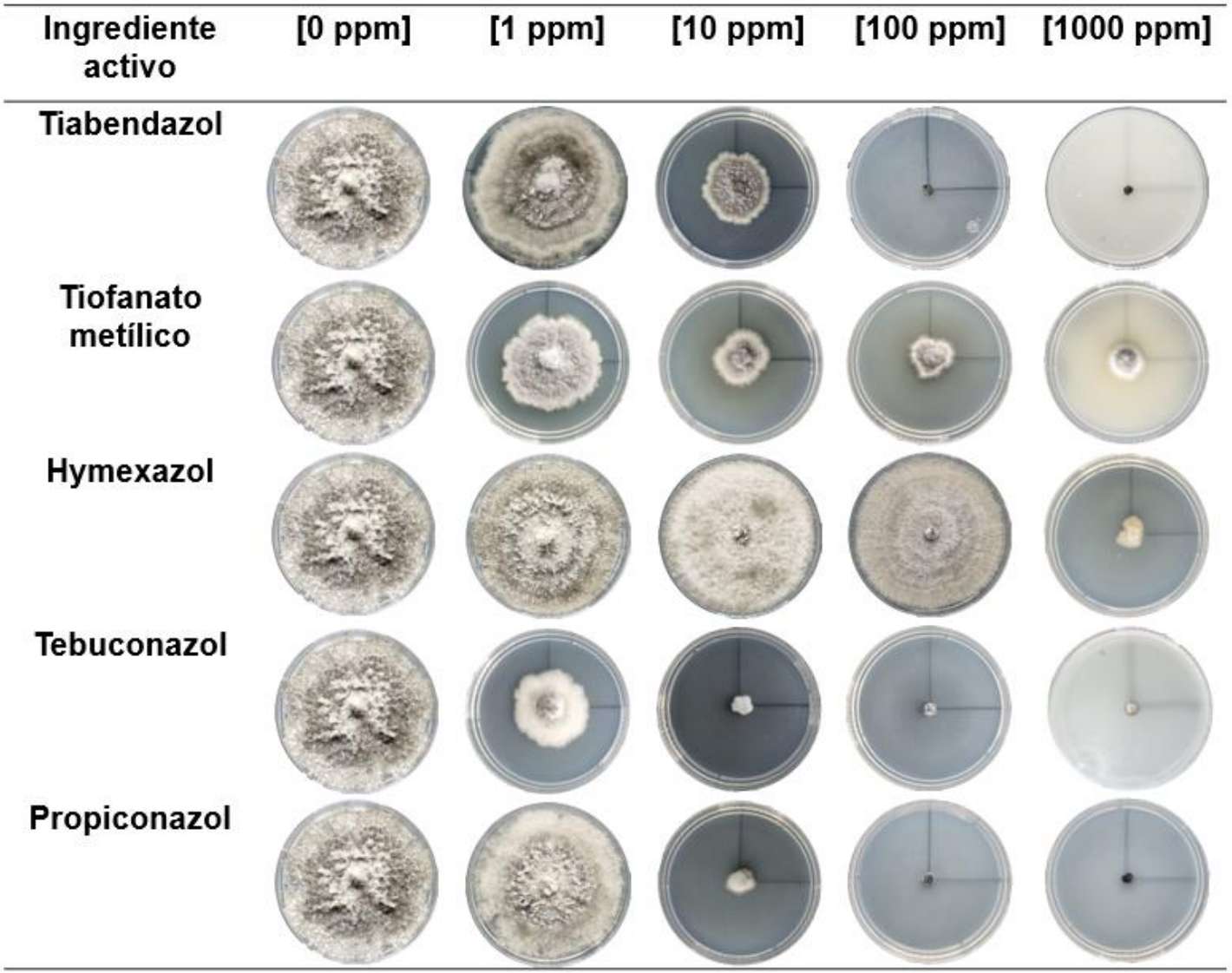

Figura 25. Crecimiento micelial del aislado H3Ais3B a los siete días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H3Ais3N. Se presentó inhibición del crecimiento micelial del 94 al 100% con dosis de 10, 100 y 1000 ppm de propiconazol y tebuconazol y 1000 ppm de hymexazol y tiabendazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 12). En la Figura 26 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H3Ais3N a los seis días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 12. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais3N por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	74.3 BC
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	74.1 BC
Tebuconazol 10 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	71.7 BCD
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Hymexazol 100 ppm	67.4 CD
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 10 ppm	64.2 DE
Propiconazol 10 ppm	99.4 A	Tiofanato metílico 1 ppm	57.0 E
Tiabendazol 1000 ppm	96.4 A	Propiconazol 1 ppm	38.7 F
Hymexazol 1000 ppm	94.0 A	Hymexazol 10 ppm	17.9 G
Tiabendazol 100 ppm	77.6 B	Tiabendazol 1 ppm	6.3 H
Tiofanato metílico 1000 ppm	75.2 BC	Hymexazol 1 ppm	0.3 H

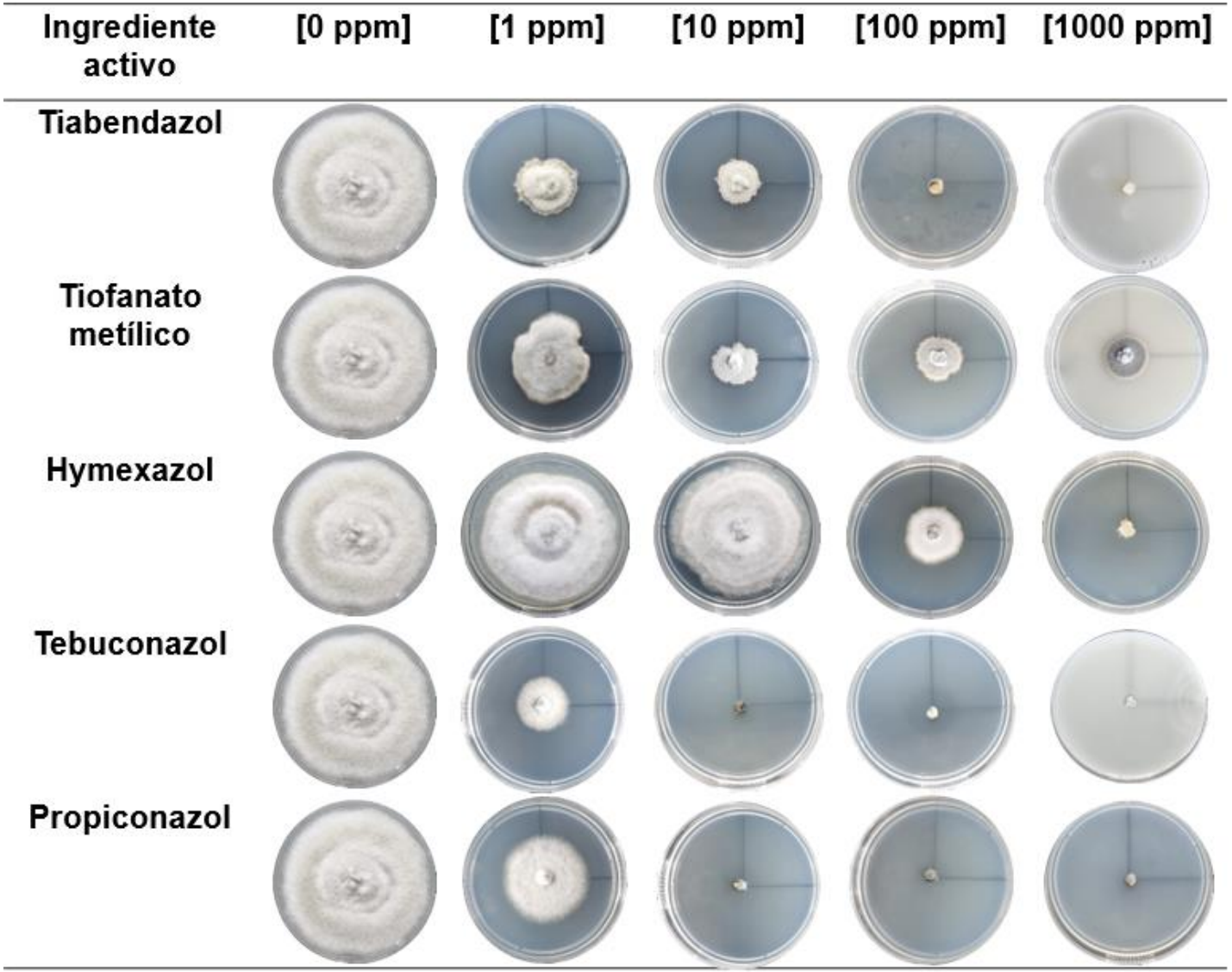

Figura 26. Crecimiento micelial del aislado H3Ais3N a los seis días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H3Ais4. Presentó inhibición del crecimiento micelial del 96-100% en dosis a partir de 10 ppm de tebuconazol, 100 y 1000 ppm de tiabendazol y propiconazol, y 1000 ppm de hymexazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 13). Por otro lado, el tratamiento de 1 ppm de hymexazol no presentó inhibición del crecimiento micelial del patógeno. En la Figura 27 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H3Ais4 a los cinco días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 13. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais4 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 10 ppm	79.5 C
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1000 ppm	78.0 CD
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	77.6 CD
Tebuconazol 10 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	73.2 DE
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	71.9 E
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	58.9 F
Propiconazol 100 ppm	99.3 A	Propiconazol 1 ppm	53.8 F
Hymexazol 1000 ppm	96.1 A	Tiabendazol 1 ppm	47.3 G
Propiconazol 10 ppm	88.0 B	Hymexazol 10 ppm	18.2 H
Hymexazol 100 ppm	82.3 BC	Hymexazol 1 ppm	0.0 I

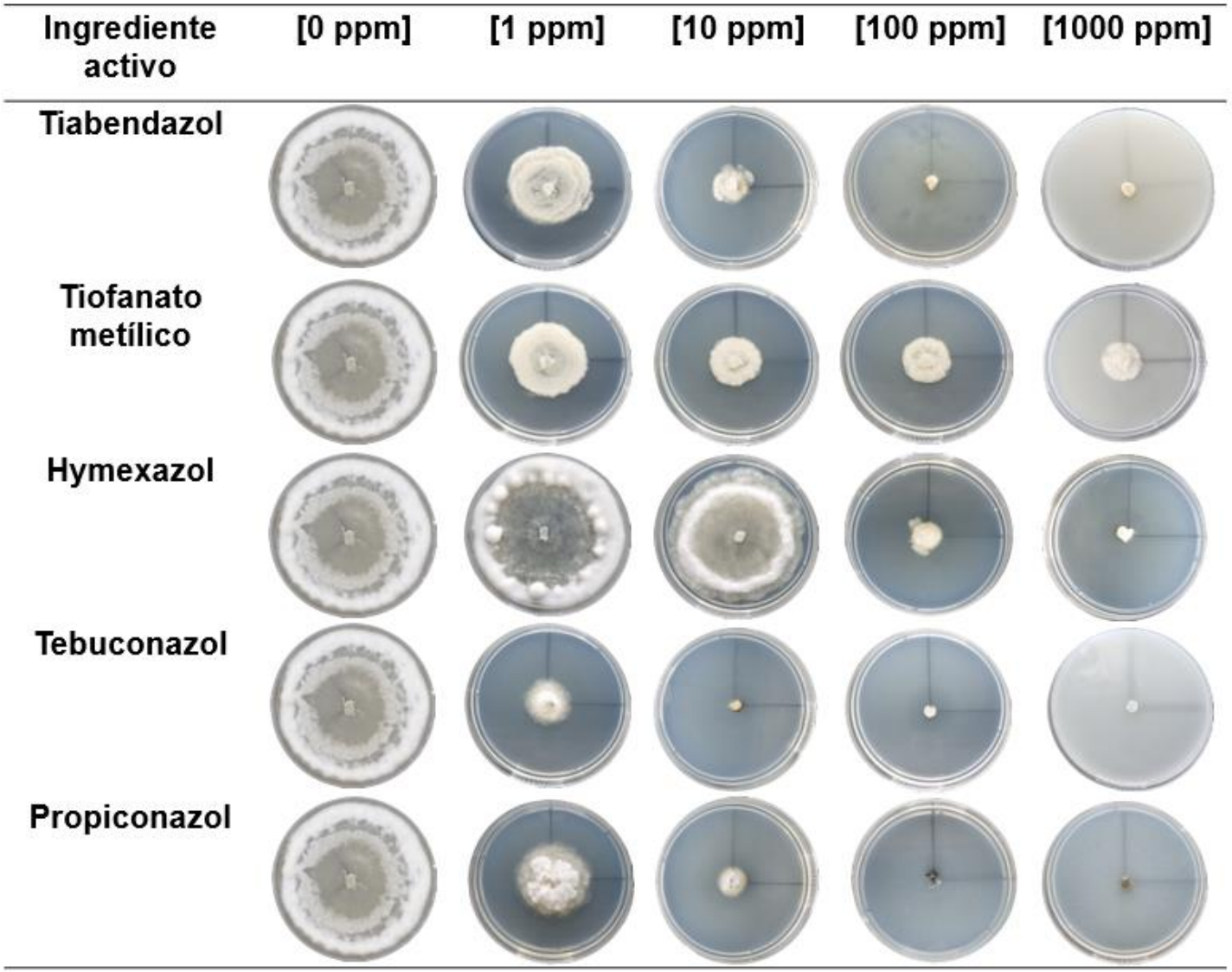

Figura 27. Crecimiento micelial del aislado H3Ais4 a los cinco días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H3Ais5. Presentó inhibición del crecimiento micelial del 93-100% en dosis a partir de 10 ppm de tebuconazol y propiconazol, 100 ppm de tiabendazol, y 1000 ppm de hymexazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 14). Por otro lado, los tratamientos de 1 y 10 ppm de hymexazol no presentaron inhibición del crecimiento micelial del patógeno. En la Figura 28 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H3Ais5 a los siete días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 14. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais5 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	70.1 B
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	60.5 C
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Tiabendazol 10 ppm	60.0 C
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Propiconazol 1 ppm	60.0 C
Tebuconazol 10 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	56.0 CD
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	48.4 D
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 1 ppm	35.7 E
Propiconazol 10 ppm	94.2 A	Hymexazol 100 ppm	15.0 F
Hymexazol 1000 ppm	93.0 A	Hymexazol 1 ppm	0.0 G
Tiofanato metílico 1000 ppm	72.9 B	Hymexazol 10 ppm	0.0 G

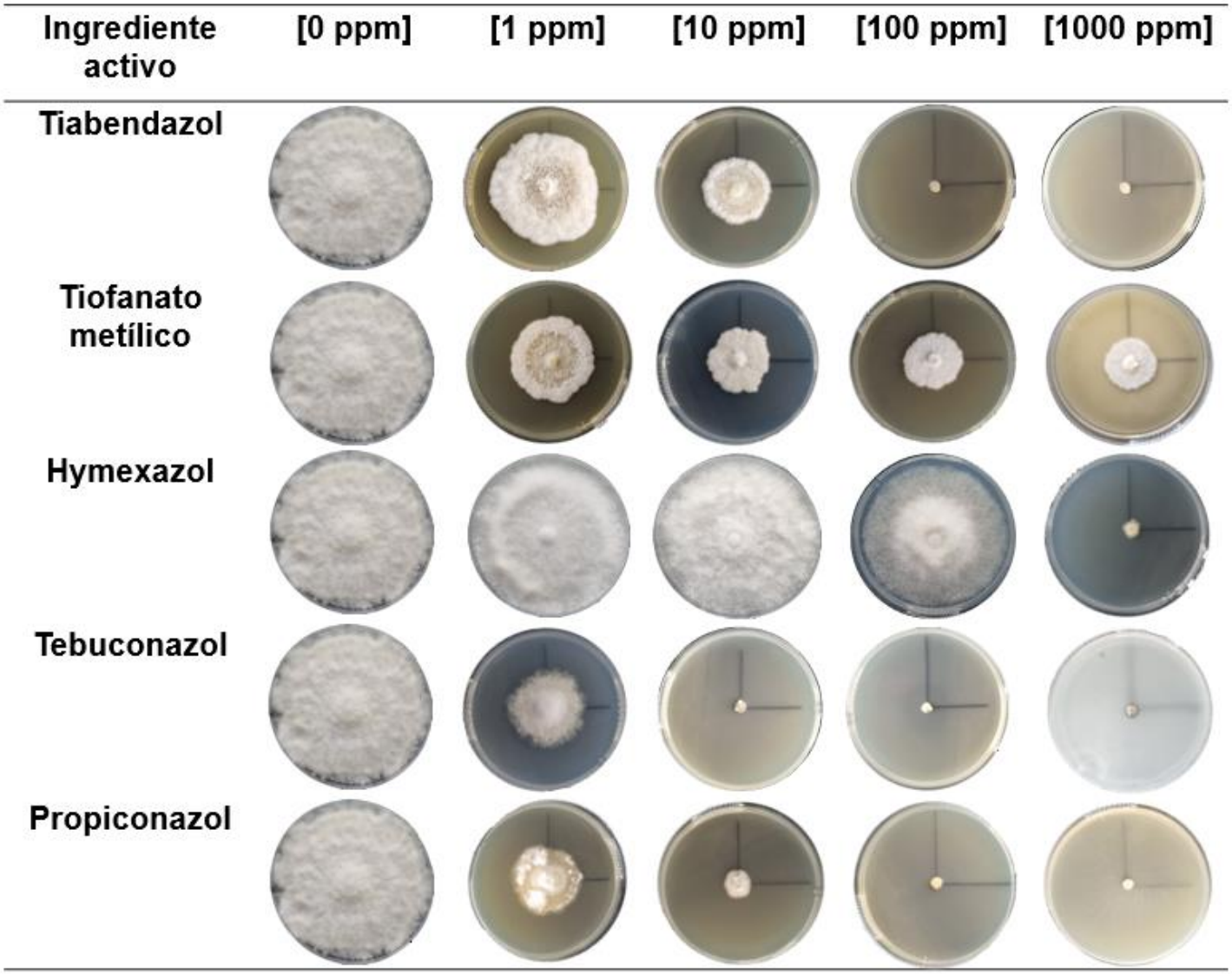

Figura 28. Crecimiento micelial del aislado H3Ais5 a los siete días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H4Ais1. Presentó inhibición del crecimiento micelial del 90-100% en dosis a partir de 10 ppm de tebuconazol y propiconazol y 1000 ppm de tiabendazol e hymexazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 15). En la Figura 29 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H4Ais1 a los ocho días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 15. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H4Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	78.1 CD
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1000 ppm	78.1 CD
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	75.6 CD
Propiconazol 100 ppm	97.9 A	Tiabendazol 10 ppm	68.0 DE
Hymexazol 1000 ppm	97.4 A	Propiconazol 1 ppm	58.7 EF
Tiabendazol 1000 ppm	96.1 A	Tiofanato metílico 1 ppm	51.2 FG
Propiconazol 10 ppm	95.6 AB	Hymexazol 100 ppm	38.0 G
Tebuconazol 10 ppm	94.7 AB	Tiabendazol 1 ppm	36.6 G
Tiabendazol 100 ppm	90.3 ABC	Hymexazol 10 ppm	13.2 H
Tebuconazol 1 ppm	80.8 BCD	Hymexazol 1 ppm	0.6 H

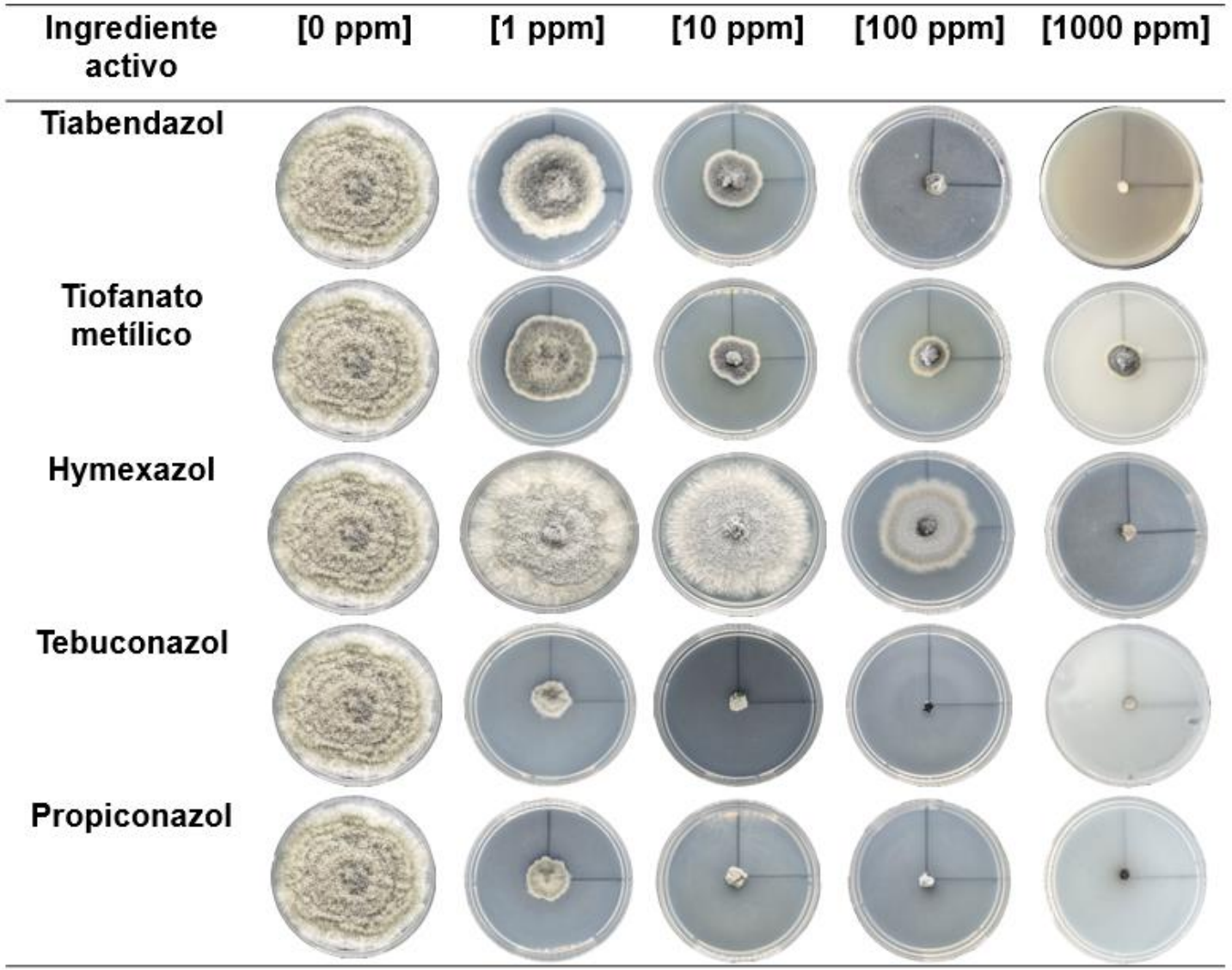

Figura 29. Crecimiento micelial del aislado H4Ais1 a los ocho días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H4Ais2. Presentó inhibición del crecimiento micelial del 92-100% en dosis a partir de 100 ppm propiconazol y tebuconazol y 1000 ppm de tiabendazol e hymexazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 16). Por otro lado, los tratamientos de 1 y 10 ppm de hymexazol y 1 ppm de propiconazol y tebuconazol no presentaron inhibición del crecimiento micelial del patógeno. En la Figura 30 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H4Ais2 a los ocho días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 16. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H4Ais2 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	82.4 C
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	76.7 C
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tiabendazol 10 ppm	55.1 D
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	22.5 E
Tiabendazol 1000 ppm	92.6 AB	Hymexazol 100 ppm	15.8 EF
Hymexazol 1000 ppm	92.3 AB	Tiabendazol 1 ppm	7.9 FG
Tiofanato metílico 1000 ppm	86.4 BC	Hymexazol 10 ppm	0.7 G
Propiconazol 10 ppm	83.9 BC	Hymexazol 1 ppm	0.0 G
Tebuconazol 10 ppm	83.5 BC	Propiconazol 1 ppm	0.0 G
Tiabendazol 100 ppm	82.7 BC	Tebuconazol 1 ppm	0.0 G

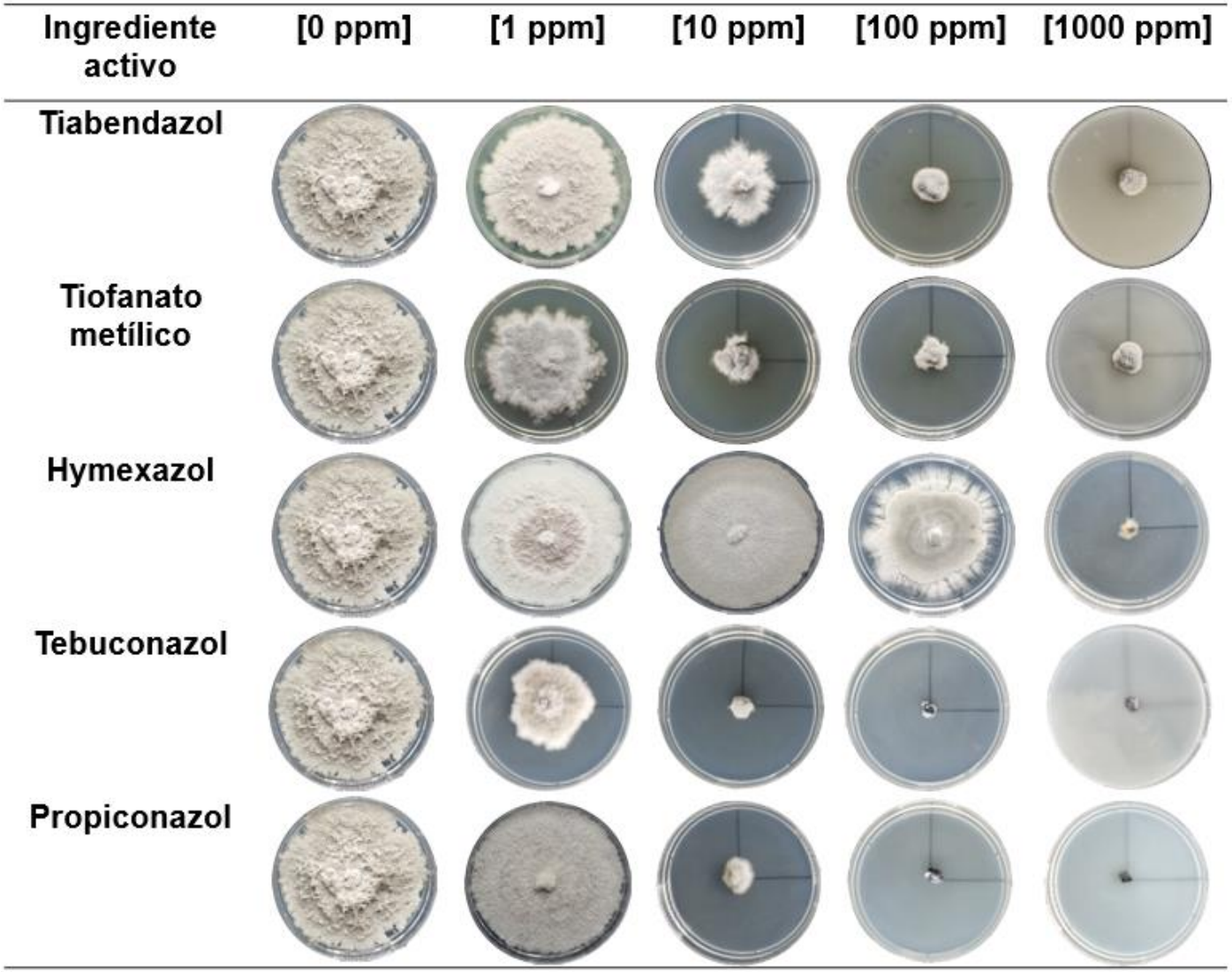

Figura 30. Crecimiento micelial del aislado H4Ais2 a los ocho días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H5Ais1. Presentó inhibición del crecimiento micelial del 94-100% en dosis a partir de 10 ppm de tebuconazol, 100 ppm de propiconazol y 1000 ppm de tiabendazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 17). En la Figura 31 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H5Ais1 a los 12 días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 17. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H5Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	80.6 EFG
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 100 ppm	77.2 FG
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	73.7 GH
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	68.0 H
Tebuconazol 10 ppm	95.0 AB	Tiabendazol 10 ppm	66.4 H
Tiabendazol 1000 ppm	94.5 ABC	Propiconazol 1 ppm	57.3 I
Propiconazol 10 ppm	90.8 BCD	Tiabendazol 1 ppm	46.8 J
Hymexazol 1000 ppm	89.3 BCD	Hymexazol 100 ppm	28.2 K
Tiofanato metílico 1000 ppm	87.1 CDE	Hymexazol 1 ppm	27.9 K
Tiofanato metílico 100 ppm	84.3 DEF	Hymexazol 10 ppm	18.8 L

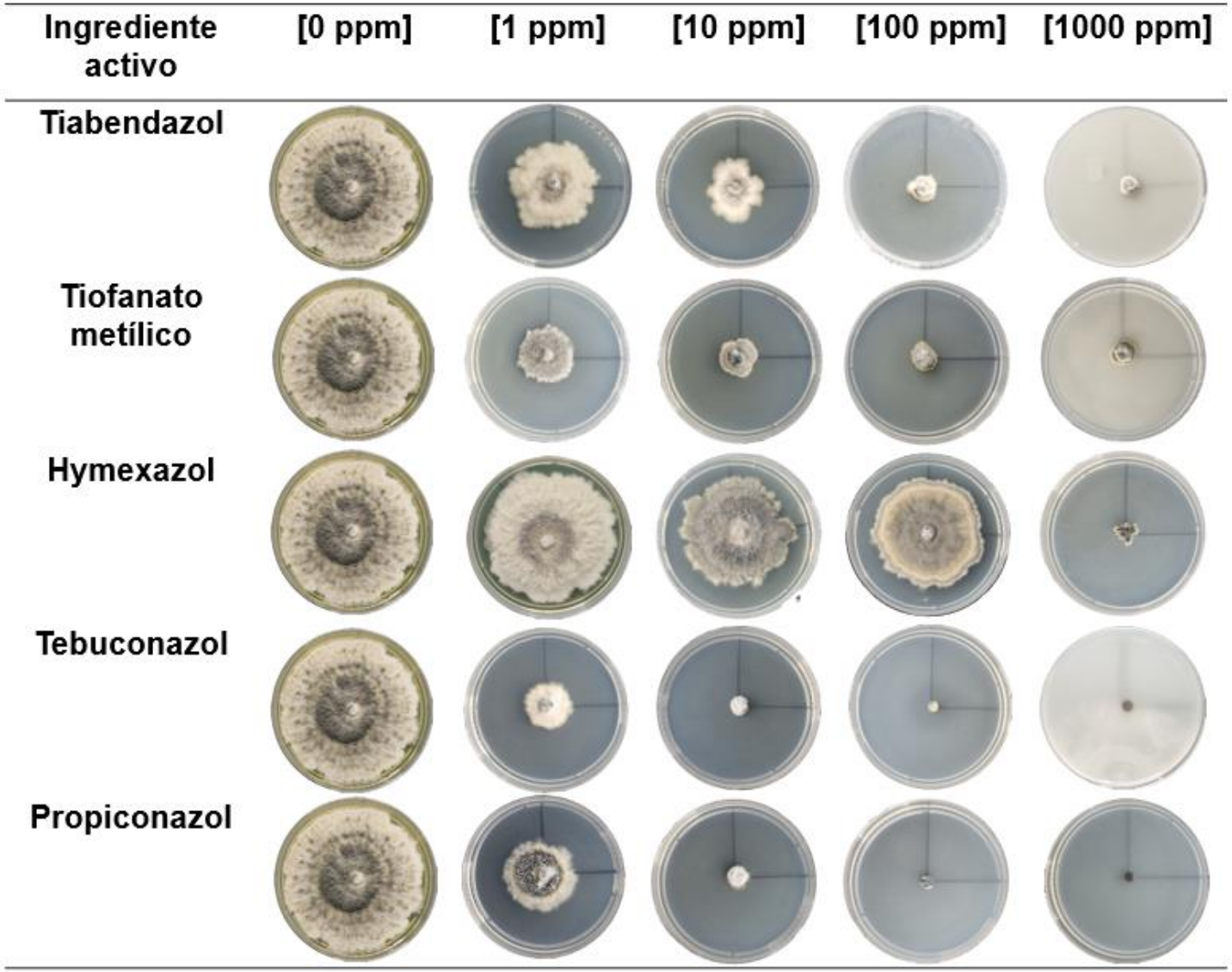

Figura 31. Crecimiento micelial del aislado H5Ais1 a los 12 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H5Ais2. Presentó inhibición del crecimiento micelial del 100% en dosis de 100 y 1000 ppm de propiconazol, tiabendazol y tebuconazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 18). Por otro lado, los tratamientos de 1, 10 y 100 ppm de hymexazol no presentaron inhibición del crecimiento del patógeno. En la Figura 32 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H5Ais2 a los cinco días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 18. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H5Ais2 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	71.0 CD
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	64.6 DE
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Propiconazol 1 ppm	59.5 E
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	58.2 E
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tiabendazol 10 ppm	42.9 F
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	16.0 G
Tebuconazol 10 ppm	89.6 B	Tiabendazol 1 ppm	9.5 G
Propiconazol 10 ppm	86.8 B	Hymexazol 1 ppm	0.0 H
Hymexazol 1000 ppm	86.1 B	Hymexazol 10 ppm	0.0 H
Tiofanato metílico 1000 ppm	75.0 C	Hymexazol 100 ppm	0.0 H

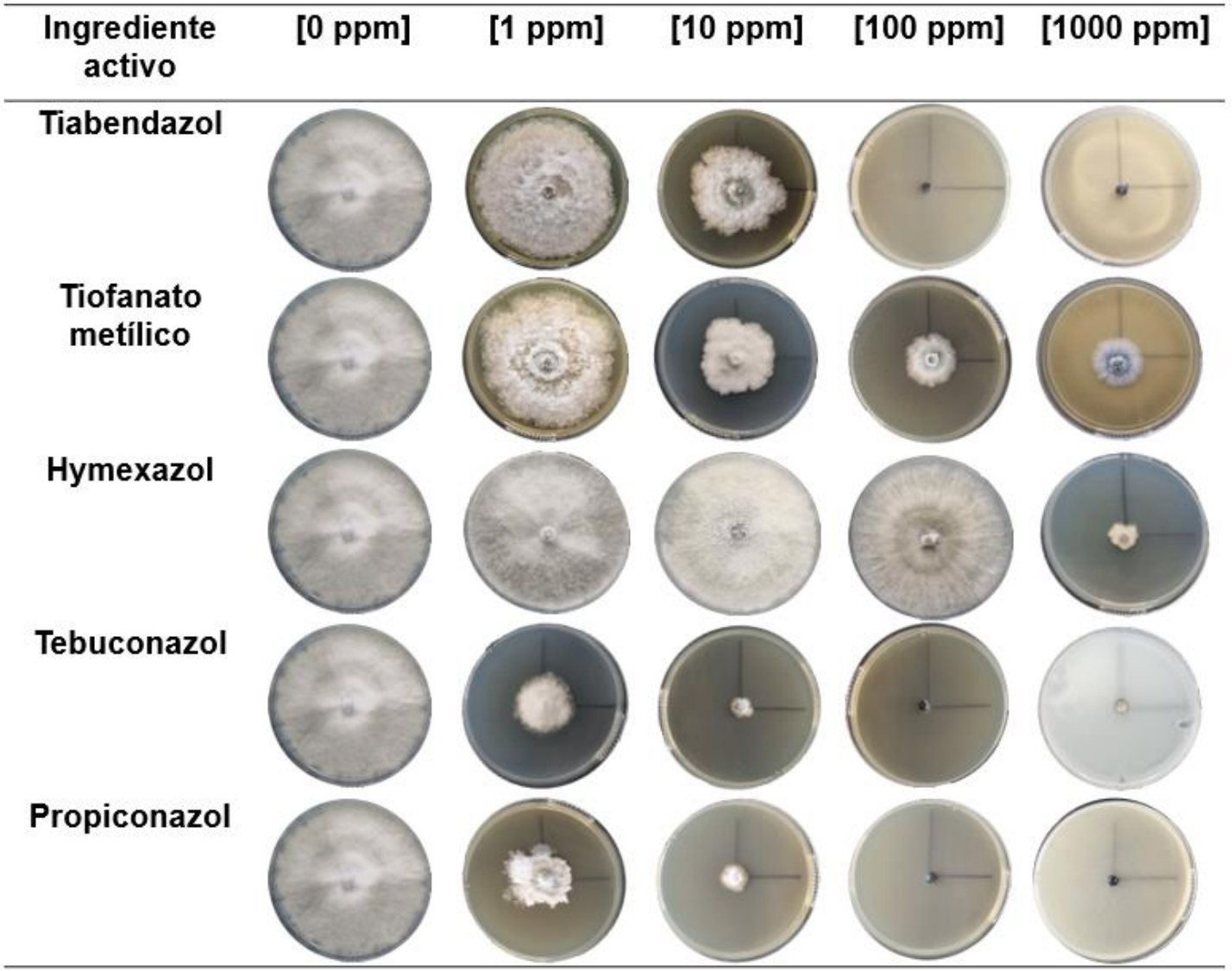

Figura 32. Crecimiento micelial del aislado H5Ais2 a los cinco días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

4.6.2. Familia *Pleurostomataceae*

4.6.2.1 Aislados de *Pleurostoma* spp.

De acuerdo con los resultados de la identificación molecular, estos aislados pertenecen a *Pleurostoma richardsiae.* En los aislados de este género (H2Ais1 y H4Ais3) el análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mostró diferencias altamente significativas (P= 0.001) (Anexo 4), además se observó que a mayor concentración de ingrediente activo la inhibición del crecimiento micelial fue mayor.

H2Ais1. Presentó inhibición del 90-100% en dosis a partir de 10 ppm de propiconazol, tiofanato metílico, tiabendazol y tebuconazol, siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 19). Por otro lado, los tratamientos de 1 y 10 ppm de hymexazol no presentaron inhibición del crecimiento micelial del patógeno, sin embargo, presentaron crecimiento mayor con respecto al testigo (0 ppm). En la Figura 33 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H2Ais1 a los 18 días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo se detuvo el crecimiento micelial del tratamiento testigo.

Cuadro 19. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H2Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tebuconazol 10 ppm	93.4 AB
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Propiconazol 10 ppm	90.0 AB
Tiabendazol 10 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	68.8 BC
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Propiconazol 1 ppm	59.2 C
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 1 ppm	53.1 C
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Hymexazol 1000 ppm	25.3 D
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	5.4 DE
Tiofanato metílico 10 ppm	100.0 A	Hymexazol 100 ppm	1.3 DE
Tiofanato metílico 100 ppm	100.0 A	Hymexazol 10 ppm	-5.2 E
Tiofanato metílico 1000 ppm	100.0 A	Hymexazol 1 ppm	-34.5 F

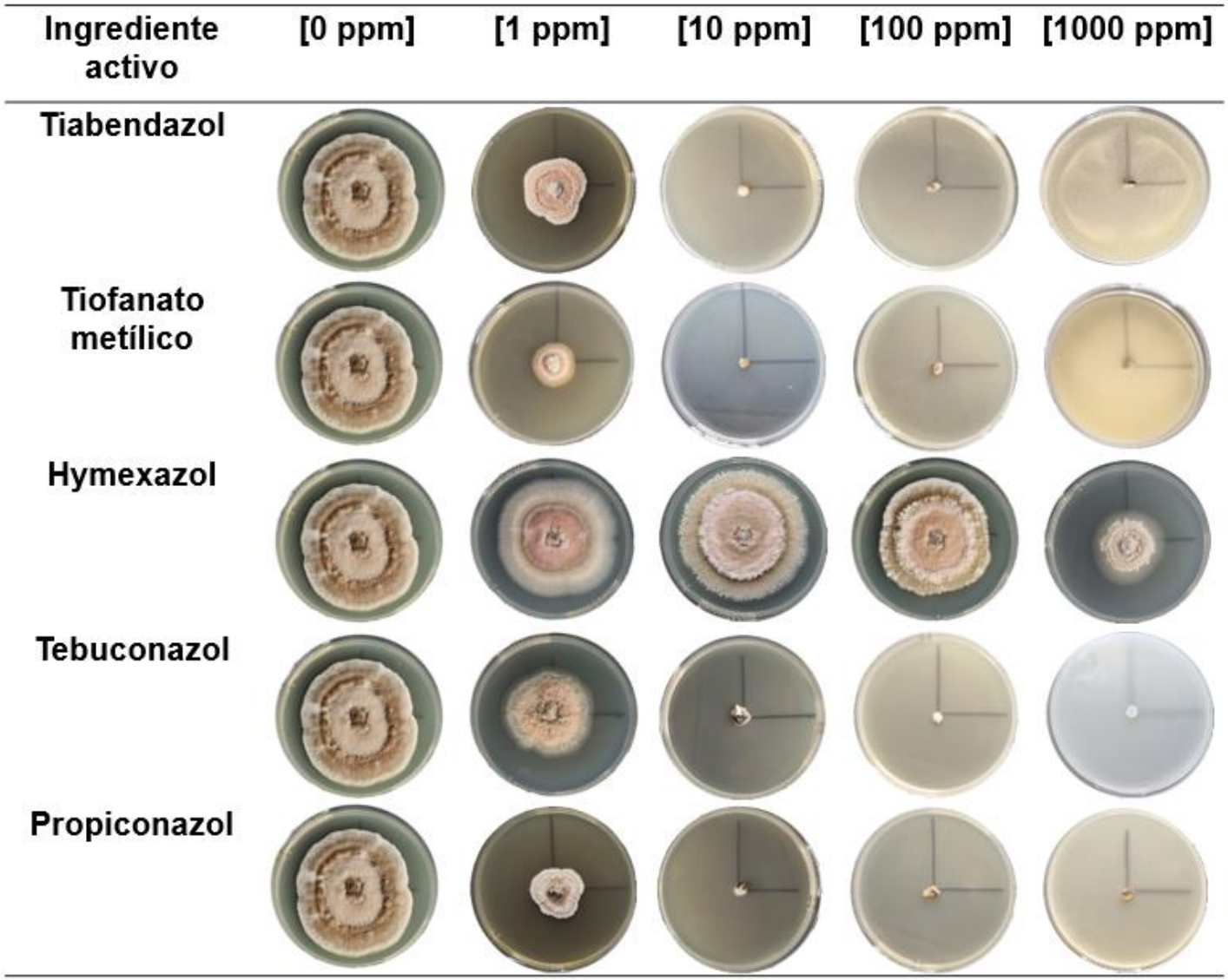

Figura 33. Crecimiento micelial del aislado H2Ais1 a los 18 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

H4Ais3. Presentó inhibición de 87-100% en dosis a partir de 10 ppm de tebuconazol, tiofanato metílico y tiabendazol y 100 ppm de propiconazol siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 20). Los tratamientos de 1 ppm de tebuconazol y tiabendazol y 1, 10, 100 y 1000 ppm de hymexazol no presentaron inhibición del crecimiento micelial del patógeno, sin embargo, presentaron crecimiento mayor con respecto al testigo. En la Figura 34 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H4Ais3 a los 18 días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo se detuvo el crecimiento micelial del testigo.

Cuadro 20. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H4Ais3 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tebuconazol 10 ppm	87.0 AB
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Propiconazol 10 ppm	70.2 BC
Tiabendazol 10 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 1 ppm	49.3 CD
Tiabendazol 100 ppm	100.0 A	Propiconazol 1 ppm	29.0 D
Tiabendazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 1 ppm	-0.5 E
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Hymexazol 1000 ppm	-4.7 EF
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiabendazol 1 ppm	-10.8 EF
Tiofanato metílico 10 ppm	100.0 A	Hymexazol 100 ppm	-29.1 F
Tiofanato metílico 100 ppm	100.0 A	Hymexazol 1 ppm	-57.9 G
Tiofanato metílico 1000 ppm	100.0 A	Hymexazol 10 ppm	-63.0 G

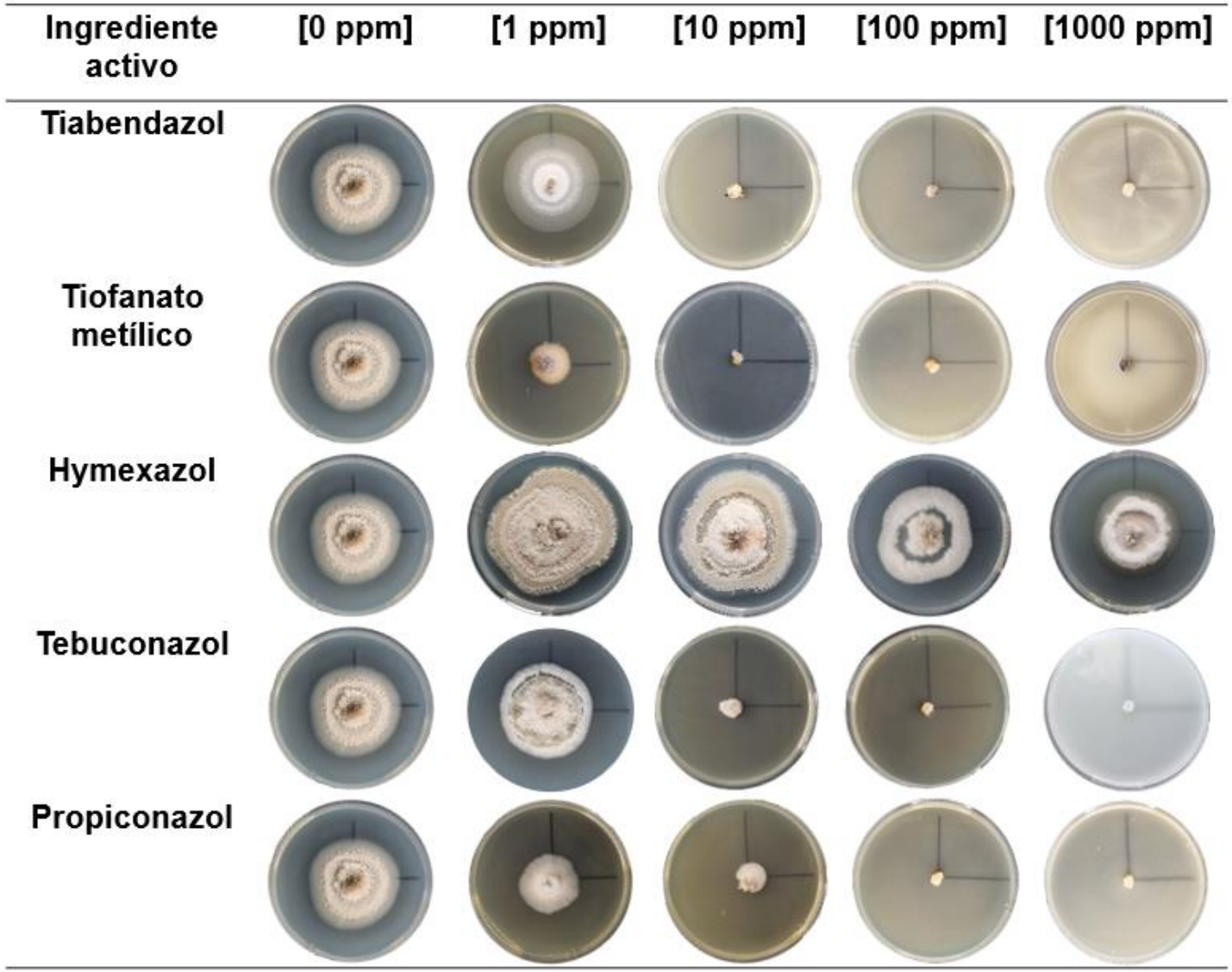

Figura 34. Crecimiento micelial del aislado H4Ais3 a los 18 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol.

4.6.3. Sensibilidad *in vitro* de aislados de la familia *Glomerellaceae*.

H3Ais1: De acuerdo con los resultados de la identificación molecular, este aislado pertenece a *Colletotrichum siamense.* El análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mostró diferencias altamente significativas (P= 0.001) entre los tratamientos (Anexo 5). Este aislado presentó inhibición del 86-100% en dosis a partir de 10 ppm de propiconazol, 100 ppm de tebuconazol y 1000 ppm de tiofanato metílico, tiabendazol e hymexazol siendo estadísticamente iguales (P= 0.05) (Cuadro 21). En la Figura 35 se observa la inhibición del crecimiento micelial de H3Ais1 a los 10 días de la siembra de las cajas Petri, en este tiempo el crecimiento micelial del tratamiento testigo cubrió la superficie de la caja.

Cuadro 21. Comparación de medias del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de H3Ais1 por efecto de cinco fungicidas a cinco dosis. Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05).

Tratamiento	Inhibición (%)	Tratamiento	Inhibición (%)
Propiconazol 100 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 100 ppm	77.9 BC
Propiconazol 1000 ppm	100.0 A	Tebuconazol 10 ppm	72.7 CD
Tebuconazol 100 ppm	100.0 A	Tiabendazol 1 ppm	58.6 DE
Tebuconazol 1000 ppm	100.0 A	Tiofanato metílico 10 ppm	55.7 E
Hymexazol 1000 ppm	89.8 AB	Tiofanato metílico 1 ppm	48.4 E
Tiofanato metílico 1000 ppm	89.8 AB	Propiconazol 1 ppm	45.1 E
Tiabendazol 1000 ppm	87.4 ABC	Tebuconazol 1 ppm	25.4 F
Propiconazol 10 ppm	86.3 ABC	Hymexazol 100 ppm	6.3 G
Tiabendazol 100 ppm	79.6 BC	Hymexazol 1 ppm	0.0 G
Tiabendazol 10 ppm	78.2 BC	Hymexazol 10 ppm	0.0 G

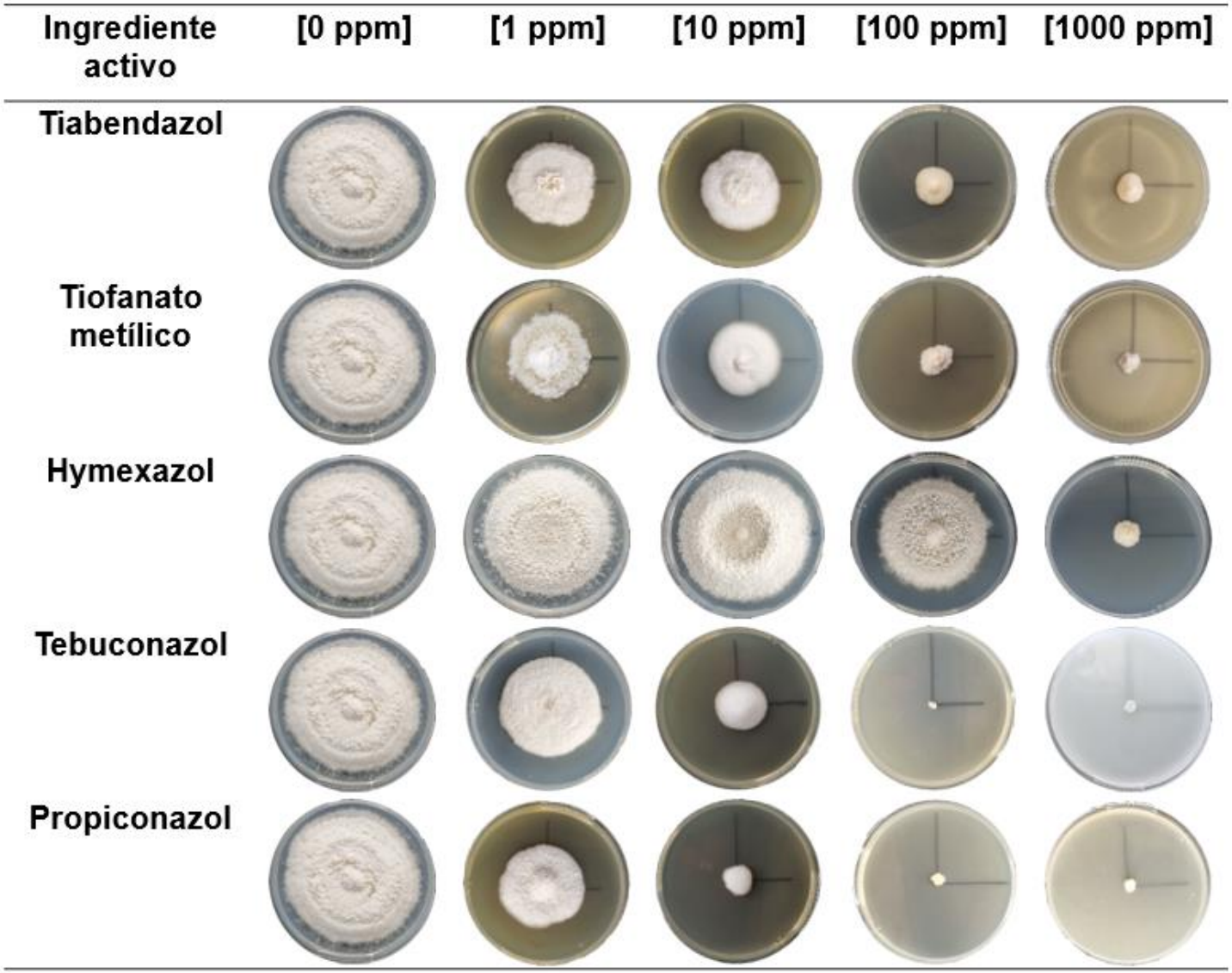

Figura 35. Crecimiento micelial del aislado H3Ais1 a los 10 días de exposición a dosis de 0, 1, 10, 100 y 1000 ppm de tiabendazol, tiofanato metílico, hymexazol, tebuconazol y propiconazol

4.7. Porcentajes de inhibición y determinación de EC_{50}

La EC_{50} para cada uno de los aislados con respecto a los tratamientos se muestran en el Cuadro 22. Para los aislados de *Lasiodiplodia* (posibles especies: *L. theobromae, L. citricola* o *L. parva*) y *Botryosphaeria dothidea* se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición con los fungicidas tiabendazol, tebuconazol y propiconazol (90-100%) a dosis a partir de 100 ppm e hymexazol 1000 ppm (86-97%). Los demás tratamientos presentaron porcentajes de inhibición inferiores. La EC_{50} para estos aislados se encontraron entre los rangos: 1.21-11.71 µg/mL (tiabendazol), 0.002-13.47 µg/mL (tiofanato metílico), 31.42-831.70 µg/mL (hymexazol), 0.12-8.19 µg/mL (tebuconazol) y 0.16-8.35 µg/mL (propiconazol).

Pleurostoma richardsiae presentó los porcentajes de inhibición más altos con tiabendazol, tiofanato metílico y tebuconazol (90-100%) a dosis a partir de 10 ppm, por otro lado, se obtuvieron porcentajes de inhibición del 0-25% en todas las dosis de hymexazol. La EC_{50} para estos aislados se encontraron entre los rangos: 0.99-4.90 µg/mL (tiabendazol), 0.9-1 µg/mL (tiofanato metílico), 1875-6650 µg/mL (hymexazol), 3.30-3.90 µg/mL (tebuconazol) y 0.63-3.11 µg/mL (propiconazol).

Rolshausen y colaboradores (2010) mencionan que el producto Topsin M (i.a. tiofanato metílico) utilizado al 1% fue en general el producto más eficaz en la inhibición de nueve hongos entre los que se encontraron *Pleurostomophora richardsiae* (sinónimo homotípico de *Pleurostoma richardsiae), Lasiodiplodia theobromae, Diplodia seriata, Botryosphaeria dothidea y Dothiorella viticola.*

Colletotrichum siamense presentó los porcentajes de inhibición más altos con tebuconazol y propiconazol a 100 ppm y 1000 ppm de tiabendazol, hymexazol y tiofanato metílico (87-100%). La EC_{50} para este aislado fue: 0.14 µg/mL (tiabendazol), 2.05 µg/mL (tiofanato metílico), 358.10 µg/mL (hymexazol), 3.30 µg/mL (tebuconazol) y 1.25 µg/mL (propiconazol).

En 2012, Salazar y colaboradores mencionan que 25 aislados pertenecientes al género *Colletotrichum* fueron sensibles a tiabendazol con valores promedio de EC_{50} menores a 0.55 µg/mL lo cual coincide con los resultados obtenidos. Por otro lado, Wong y Midland (2007) obtuvieron valores de EC_{50} para propiconazol de 0.053-0.35 µg/mL y de tebuconazol 0.015-0.57 µg/mL, estos resultados reportados difieren con los resultados obtenidos es esta investigación.

Cuadro 22. Valores EC_{50} de los aislados sometidos a pruebas de sensibilidad *in vitro* a cinco fungicidas.

Especies	Aislado	Fungicida	EC50 (µg/mL)	Error estándar
Lasiodiplodia (*L. citricola, L. parva* o *L. theobromae*)	H1Ais1	Tiabendazol	1.53	0.007
		Tiofanato metílico	0.002	0.69
		Hymexazol	158.7	3.87
		Tebuconazol	0.31	0.23
		Propiconazol	0.16	1.47
Botryosphaeria dothidea	H1Ais2	Tiabendazol	1.54	6.33
		Tiofanato metílico	2.63	4.07
		Hymexazol	87.5	4.31
		Tebuconazol	0.86	1.01
		Propiconazol	0.52	0.85
Botryosphaeria dothidea	H3Ais2	Tiabendazol	10.06	5.20E-005
		Tiofanato metílico	0.16	0.84
		Hymexazol	712	9.64E-010
		Tebuconazol	0.92	0.59
		Propiconazol	7.65	1.87E-006
Botryosphaeria dothidea	H3Ais3B	Tiabendazol	8.25	2.55
		Tiofanato metílico	1.78	7.68
		Hymexazol	831.7	7.07E-006
		Tebuconazol	0.89	1.18
		Propiconazol	7.76	1.33E-007
Botryosphaeria dothidea	H3Ais3N	Tiabendazol	7.93	12.36
		Tiofanato metílico	0.02	6.11
		Hymexazol	48.31	1.79
		Tebuconazol	0.84	1.81E-010
		Propiconazol	1.21	0.002
Botryosphaeria dothidea	H3Ais4	Tiabendazol	1.21	3.45
		Tiofanato metílico	0.04	3.84
		Hymexazol	31.42	2.19
		Tebuconazol	0.89	7.07E-006
		Propiconazol	0.84	0.95
Botryosphaeria dothidea	H3Ais5	Tiabendazol	3.22	9.27
		Tiofanato metílico	1.53	2.92
		Hymexazol	252.4	0.17
		Tebuconazol	0.95	7.07E-007
		Propiconazol	0.68	0.39

Cuadro 22. Continuación…

Especies	Aislado	Fungicida	EC50 (µg/mL)	Error estándar
Botryosphaeria dothidea	H4Ais1	Tiabendazol	2.61	1.05
		Tiofanato metílico	0.37	6.98
		Hymexazol	134.8	7.78
		Tebuconazol	0.12	0.85
		Propiconazol	0.74	1.25
Botryosphaeria dothidea	H4Ais2	Tiabendazol	9.94	6.98
		Tiofanato metílico	3.66	13.11
		Hymexazol	252.4	0.29
		Tebuconazol	8.19	7.066E-005
		Propiconazol	8.35	7.066E-006
Botryosphaeria dothidea	H5Ais1	Tiabendazol	1.53	3.96
		Tiofanato metílico	0.01	2.70
		Hymexazol	154.3	22.08
		Tebuconazol	0.30	0.51
		Propiconazol	0.72	0.93
Botryosphaeria dothidea	H5Ais2	Tiabendazol	11.71	5.74
		Tiofanato metílico	13.47	12.79
		Hymexazol	812.5	1.14E-015
		Tebuconazol	0.44	1.54
		Propiconazol	0.59	2.07
Pleurostoma richardsiae	H2Ais1	Tiabendazol	0.99	4.99E-010
		Tiofanato metílico	0.9	1.51E-012
		Hymexazol	6650	0.65
		Tebuconazol	3.3	0.02
		Propiconazol	0.63	1.28
Pleurostoma richardsiae	H4Ais3	Tiabendazol	4.9	1.70E-014
		Tiofanato metílico	1.00	1.50E-010
		Hymexazol	1875	7.06E-007
		Tebuconazol	3.94	0.099
		Propiconazol	3.11	4.18
Colletotrichum siamense	H3Ais1	Tiabendazol	0.14	4.58
		Tiofanato metílico	2.05	5.38
		Hymexazol	358.1	0.036
		Tebuconazol	3.3	2.96
		Propiconazol	1.25	1.37

5. CONCLUSIONES

Se aislaron 14 hongos provenientes de árboles con síntomas de muerte regresiva del municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad realizadas a todos los aislados obtenidos estableció su relación con la muerte regresiva de los árboles de aguacate muestreados.

La caracterización morfológica y molecular de los hongos aislados asocia a *Lasiodiplodia* (posibles especies: *L. citricola, L. parva* o *L. theobromae)* y *Botryosphaeria dothidea,* pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae* como los agentes causales de la muerte regresiva de árboles de aguacate. Además, se asocian las especies *Pleurostoma richardsiae* y *Colletotrichum siamense* como agentes causales de la muerte regresiva de árboles de aguacate en Sabinas Hidalgo, Nuevo León.

Dosis a partir de 1 ppm de tiofanato metílico y 10 ppm de propiconazol, tiabendazol y tebuconazol son efectivas para la inhibición del 92-100% de *Lasiodiplodia* (posibles especies: *L. citricola, L. parva* o *L*. *theobromae*)*.*

Dosis a partir de 10 ppm de propiconazol, 100 ppm de tebuconazol y tiabendazol y 1000 ppm de hymexazol son efectivas para la inhibición del 87-100% de *Botryosphaeria dothidea.*

Dosis a partir de 10 ppm de tiofanato metílico, tebuconazol y tiabendazol y 100 ppm de propiconazol son efectivas para la inhibición del 87-100% de *Pleurostoma richardsiae.*

Dosis a partir de 10 ppm de propiconazol, 100 ppm de tebuconazol y 1000 ppm de tiofanato metílico, hymexazol y tiabendazol son efectivas para la inhibición de *Colletotrichum siamense.*

Se continua con la realización de los análisis filogenéticos para determinar o corroborar la especie para cada uno de los aislados obtenidos.

Se recomienda la realización de las pruebas de sensibilidad *in vivo* de los aislados a los fungicidas de diferentes grupos químicos utilizados en esta investigación.

6. BIBLIOGRAFÍA

Acosta D., E., I. H. Almeyda L., e I. Hernández T. 2013. Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región norte. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4(4):531-542.

Agrios G. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Elsevier Academic Press. Amsterdam. 35 p.

Alama I., E. Maldonado., y E., Rodríguez-Gálvez. 2006. *Lasiodiplodia theobromae* afectando el Cultivo de Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. Universalia 11(2):4-13.

Alves A., P. W. Crous., A. Correia., and A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Diversity 28:1-13.

Amponsah N. T., E. Jones., H. J. Ridgway., and M. V. Jaspers. 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. Pest Management Science 68(5):676-683.

Arjona-Girona, I., M. T. Ariza-Fernández, D. Sarmiento, J. Navarro, V. Ruiz, y C. López-Herrera. 2015. Hongos patógenos aéreos asociados con la muerte regresiva en

ramas de aguacate en el sur de España. *En*: VIII Congreso Mundial de la Palta. Lima. 13-18 Sep. 2015. pp. 154-158.

Arjona-Girona I., D. Ruano-Rosa., and C. J. López-Herrera. 2019. Identification, pathogenicity and distribution of the causal agents of dieback in avocado orchards in Spain. Spanish Journal of Agricultural Research 17(1):e1003.

Becerra M., D., J. E. Corrales G., A. Almaraz S., V. Ayala E., and D. Nieto A. 2019. First report of *Neofusicoccum parvum*, causal agent of dieback on 'Hass' avocado branches (*Persea americana* cv. Hass) in Atlixco, México. Plant Disease 103(12):3283.

Carlucci A., F. Cibelli, F. Lops, A. J. L. Phillips, C. Ciccarone, and M. L. Raimondo. 2015. *Pleurostomophora richardsiae* associated with trunk diseases of grapevines in southern Italy. Phytopathologia Mediterranea 54(1):109-123.

Choi I. Y. 2011. First report of bark dieback on blueberry caused by *Botryosphaeria dothidea* in Korea. Plant Disease 95(2):227-227.

Coutinho I. B. L., F. C. O. Freire, C. S. Lima, J. S. Lima, F. J. T. Gonçalves, A. R. Machado, A. M. S. Silva, and J. E. Cardoso. 2017. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. Plant Pathology 66(1):90-104.

Cruywagen E. M., B. Slippers, J. Roux, and M. J. Wingfield. 2017. Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: a case study on species from baobabs. Fungal Biology 121(4):420-436.

Dann, E. K., R. C. Ploetz, L. M. Coates, and K. G. Pegg. 2013. Foliar, fruit and soilborne diseases. *In*: The avocado: botany, production and uses. Wallingford UK: CABI Publishing. pp. 380-422.

Delgado-Cerrone L., P. Mondino-Hintz, and S. Alaniz-Ferro. 2016. *Botryosphaeriaceae* species associated with stem canker, die-back and fruit rot on apple in Uruguay. European Journal of Plant Pathology 146(3):637-655.

Díaz L. D., y Y. Romero. R. 2016. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos de Cultivos de Aguacate (*Persea americana* Mill). Tlamati Sabiduría 7(1):210-219.

Fayyaz A., P. Bonello, M. R. Tufail, L. Amrao, A. Habib, Y. Gai, and S. T. Sahi. 2018. First report of citrus withertip (tip dieback), a disease complex caused by *Colletotrichum siamense* and *Lasiodiplodia iraniensis*, on Citrus reticulata cv. Kinnow in Punjab, Pakistan. Plant Disease 102(12):2659-2659.

García O., S. Perera, A. Rodríguez, y F. Siverio. 2017. Enfermedades del aguacate causadas por especies de hongos de la familia *Botryosphaeriaceae*. Dirección General de Agricultura. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas. Gobierno de Canarias. 3-9 p.

GIIIA (Grupo Interdisciplinario e Interinstitucional de Investigación en Aguacate) Bautista N., H. Beltrán, A. Castañeda, M. Chávez, A. Equihua, E. Durán, y R. Lomelí. 2013. El Aguacate en Michoacán: plagas y enfermedades. APEAM, Uruapan, Michoacán, Mexico. 36-56 p.

Glass N. L., and G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology 61(4):1323-1330.

Gutiérrez-Díez A., E. I. Sánchez-González, J. A. Torres-Castillo, I. M. Cerda-Hurtado, and M. D. C. Ojeda-Zacarías. 2015. Genetic diversity of mexican avocado in

Nuevo Leon, Mexico. *In*: Molecular Approaches to Genetic Diversity. Ç., Mahmut, K. Halil, Gül, CÖ, O. Birgul. Eds. p. 141-159.

Hepperle D. 2004. SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences. Win32-Version. Distributed by the author via: http://www.sequentix.de.

Inch S., R. Ploetz, B. Held, and R. Blanchette. 2012. Histological and anatomical responses in avocado, *Persea americana*, induced by the vascular wilt pathogen, *Raffaelea lauricola*. Botany 90(7):627-635.

Lawrence D. P., M. T. Nouri, and F. P. Trouillas. 2021. *Pleurostoma* decline of olive trees caused by *Pleurostoma richardsiae* in California. Plant Disease 105(8):2149-2159.

Lee S. B., and J. W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. PCR protocols, a guide to methods and applications. *In*: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press. San Diego. 282-287 p.

Ludwing N., B., J. P. Edwards M., and A. F. Nogueira J. 2022. Penetration by *Botryosphaeriaceae* species in avocado, guava and persimmon fruit during postharvest. Journal of Phytopathology 170(1):57-68.

Marsberg A., M. Kemler, F. Jami, J. H. Nagel, A. Postma-Smidt, S. Naidoo, M. J. Wingfield, P. W. Crous, J. W. Spatafora, C. N. Hesse, B. Robbertse, and B. Slippers. 2017. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. Molecular Plant Pathology 18(4):477-488.

Mayfield A. E., J. E. Peña, J. H. Crane, J. A. Smith, C. L. Branch, E. D. Ottoson, and M. Hughes. 2008. Ability of the redbay ambrosia beetle (Coleoptera:

Curculionidae: Scolytinae) to bore into young avocado (*Lauraceae*) plants and transmit the laurel wilt pathogen (*Raffaelea* sp.). The Florida Entomologist 91(3):485-487.

Mayfield A. E., S. W. Fraedrich, and P. Merten. 2019. Laurel wilt. Pest Alert. R8-PR-01-19.

McDonald V. and A. Eskalen, 2011. *Botryosphaeriaceae* species associated with avocado branch cankers in California. Plant Disease 95(11):1465-1473.

Mendiburu F. D. 2015. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R Package Version 1.2-3. http://CRAN.R-project.org/package=agricolae

Menge J. A., and R. C. Ploetz. 2003. Diseases of avocado. *In:* R. C. Ploetz. (eds.). Diseases of Tropical Fruit Crops. CABI Publishing, Cambridge, MA. 527 pp.

Mondragón-Flores A., G. Rodríguez-Alvarado, N. Gómez-Dorantes, J. J. Guerra-Santos, y S. P. Fernández-Pavía. 2021. *Botryosphaeriaceae*: una familia de hongos, compleja, diversa y cosmopolita. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 12(4):643-654.

Moral J., C. Agusti-Brisach, M. Perez-Rodriguez, C. Xavier, M. C. Raya, A. Rhouma, and A. Trapero. 2017. Identification of fungal species associated with branch dieback of olive and resistance of table cultivars to *Neofusicoccum mediterraneum* and *Botryosphaeria dothidea*. Plant Disease 101(2):306-316.

O'Donnell K., and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *fusarium* are nonorthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution 7(1):103-116.

Olmo D., J. Armengol, M. León, and D. Gramaje. 2016. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species isolated from almond trees on the island of Mallorca (Spain). Plant Disease 100(12):2483-2491.

Phillips A. J. L. (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. Journal of Phytopathology 146(7):327-332.

Phillips A. J., A. Alves, J. Abdollahzadeh, B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous, 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. Studies in Mycology 76(1):51–167.

Pintos V., C., V. Redondo F., V., O. Aguin C., V. Ferreiroa M., and J. P. Mansilla V., 2016. First report of *Pleurostoma richardsiae* causing grapevine trunk disease in Spain. Plant Disease 100(10):2168-2168.

Polanco F., L. G., O. G. Alvarado G., O. Pérez G., R. González G., y E. Olivares S. 2019. Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(4):757-764.

Ramos A. P., P. Talhinhas, S. Sreenivasaprasad, and H. Oliveira. 2016. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C. karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. Phytoparasitica 44(4):549-561.

R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/.

Riolo M., F. Aloi, A. Pane, M. Cara, and S. O. Cacciola. 2021. Twig and shoot dieback of citrus, a new disease caused by *Colletotrichum* species. Cells 10(2):449.

Rodríguez-Gálvez E., S. Hilário, E. Batista, A. Lopes, and A. Alves. 2021. *Lasiodiplodia* species associated with dieback of avocado in the coastal area of Peru. European Journal of Plant Pathology 161(1):219-232.

Rolshausen P. E., J. R. Úrbez-Torres, S. Rooney-Latham, A. Eskalen, R. J. Smith, and W. D. Gubler. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. American Journal of Enology and Viticulture 61(1):113-119.

SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 Aguacate mexicano. Secretaría de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion.

Salazar E., R. Hernández, A. Tapia, y L. Gómez-Alpízar. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp) de la altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. Agronomía Costarricense 36(1):53-68.

Sandoval-Sánchez M., D. Nieto-Ángel, J. S. Sandoval-Islas, D. Téliz-Ortiz, M. Orozco-Santos, y H. Silva-Rojas. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica L*.). Agrociencia 47(1):61-73.

Sharma G., M. Maymon, and S. Freeman. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. Scientific Reports 7(1):1-16.

SIAP. 2021. Avance de Siembras y Cosechas. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado de http://infosiap.siap.gob.mx/

Smith H., G. H. J. Kemp, and M. J. Wingfield. 1994. Canker and die-back of Eucalyptus in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. Plant Pathology 43(6):1031-1034.

Sohrabi M., H. Mohammadi, M. León, J. Armengol, and Z. Banihashemi. 2020. Fungal pathogens associated with branch and trunk cankers of nut crops in Iran. European Journal of Plant Pathology 157(2):327-351.

Valencia A. L., P. M. Gil, B. A. Latorre, and I. M. Rosales. 2019. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species obtained from avocado trees with branch canker and dieback and from avocado fruit with stem end rot in Chile. Plant Disease 103(5):996-1005.

Vásquez-López A., J. A. Mora-Aguilera, E. Cárdenas-Soriano, y D. Téliz-Ortiz. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. Agrociencia 43(7):717-728.

Vilgalys R., and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. Journal of Bacteriology 172(8):4238-4246.

Wang, F., L. Zhao, G. Li, J. Huang, and T. Hsiang. 2011. Identification and characterization of *Botryosphaeria* spp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, Central China. Plant Disease 95(11):1378-1384.

Wang W., J. Zhang, and J. Li. 2020. First report of *Colletotrichum siamense* causing stem tip dieback of sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) in China. Plant Disease 104:2726-2726.

White T. J., T. Bruns, S. J. W. T. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press. San Diego. 315-322 p.

Wong F. P., and S. L. Midland. 2007. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. Plant Disease 91(12):1547-1555.

7. ANEXOS

Anexo 1. Buffer de extracción de ADN.

Componente	50 mL
1 M Tris-HCl pH 8	25 mL
5 M NaCl	15 mL
0.5 M EDTA pH 8	2 mL
SDS	2 g
PVP (MW:40000)	1.5 g
β-mercaptoetanol	0.5 mL

Anexo 2. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia* spp. (posibles especies: *L. citricola, L. parva* o *L. theobromae).*

FV	Gl	SC	CM	Fc	Sig
Tratamientos	24	142012	5917	926	<2e-16***
Error	50	320	6		

Anexo 3. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Botryosphaeria dothidea.*

Aislado	FV	Gl	SC	CM	Fc	Sig
H1Ais2	Tratamientos	24	117486	4895	496.4	<2e-16***
	Error	50	493	10		
H3Ais2	Tratamientos	24	137739	5739	512.3	<2e-16***
	Error	50	560	11		
H3Ais3B	Tratamientos	24	138067	5753	1318	<2e-16***
	Error	50	218	4		
H3Ais3N	Tratamientos	24	118585	4941	680	<2e-16***
	Error	50	363	7		
H3Ais4	Tratamientos	24	115740	4826	1484	<2e-16***
	Error	50	162	3		
H3Ais5	Tratamientos	24	122902	5121	837.8	<2e-16***
	Error	50	306	6		
H4Ais1	Tratamientos	24	115365	4807	213.9	<2e-16***
	Error	50	1124	22		
H4Ais2	Tratamientos	24	137989	5750	583.2	<2e-16***
	Error	50	493	10		
H5Ais1	Tratamientos	24	104653	4361	694.6	<2e-16***
	Error	50	314	6		
H5Ais2	Tratamientos	24	130544	5439	897	<2e-16***
	Error	50	303	6		

Anexo 4. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Pleurostoma richardsiae.*

Aislado	FV	gl	SC	CM	Fc	Sig
H2Ais1	Tratamientos	24	168310	7013	101.7	<2e-16***
	Error	50	3447	69		
H4Ais3	Tratamientos	24	234961	9790	127.8	<2e-16***
	Error	50	3829	77		

Anexo 5. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum siamense.*

Aislado	FV	gl	SC	CM	Fc	Sig
H3Ais1	Tratamientos	24	116676	4861	215.6	<2e-16***
	Error	50	1127	23		