



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

[FUNGI PATHOGENICITY TEST IN ‘HASS’ AVOCADO PLANTS RELATED TO AMBROSIAL COMPLEXES]

A. Barrientos-Martínez¹, S. G. Leyva Mir¹, M. Vargas Hernández¹,
M. Camacho Tapia¹, S. Ochoa Ascencio², E. Acuayte-Valdés³,
J. R. Bermúdez-Barrientos⁴ and A. F. Barrientos-Priego^{5*}.

¹Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. Email: abarrienmar22@gmail.com, sleyvam@chapingo.mx, mvargash@chapingo.mx, mcamachot@chapingo.mx

²Facultad de la Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. Email: salvador.ochoa@umich.mx

³Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillos, Estado de México, México. Email: acuaytevaldez@gmail.com

⁴Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (LANGEBIO-CINVESTAV), Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato, México. Email: jose.bermudez@cinvestav.mx

⁵Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México. *Email: abarrientosp@chapingo.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background: recently there has been concern for the monitoring of ambrosial complexes in Mexico that consist of a symbiotic relationship between a beetle and fungi, where the female invades a wide variety of species making galleries in the bark and wood, in which beetles reproduce and grow the fungi to feed the colony, these fungi can be a phytopathogen that can cause serious damage in the infected trees. The proximity of *Raffaelea lauricola* now present in Texas and the presence of *Fusarium euwallacea* in the north of Mexico; fungi that have caused great losses in the United States, put in risk the avocado production zones in Mexico. Consequently, the report of new fungi related to ambrosial complexes is of great importance. **Objective:** to carry out pathogenicity tests of fungi related to ambrosial complexes in avocado ‘Hass’. **Methodology:** Isolates of *Raffaelea brunnea*, *Ceratocystiopsis* sp. (pre-identified) and *Fusarium* sp., from avocado trees parasitized with ambrosial beetles from the state of Michoacán and an unidentified fungus from Chiapas (Mexico) were used. Artificial inoculations with the fungi were carried out by wounds in mature stem and shoots of the growth of the year (young) of ‘Hass’ plants, and the symptoms and the progress of the damage within the stem were evaluated. Three of the isolates underwent a molecular identification analysis with the complete region of the ITS internal transcript space. **Results:** the fungus *Ceratocystiopsis* sp. was identified as *Ophiostoma* sp. and *Fusarium* sp. such as *Fusarium solani*, both isolated from Michoacán. While the Chiapas fungus was identified belonging to the genus *Fusarium*. After inoculation, *R. brunnea* and *Fusarium* sp. stood out in pathogenicity, with greater advancement within the stem and damage that in some cases reached the pith tissue, showing leaf wilting and reddish-brown staining inside the stem. These two fungi showed differential damage progression behavior according to the type of maturity of the tissue, where *Fusarium* sp. advanced more in the young tissue and *R. brunnea* in the mature one. **Implications:** it is proposed to consider that the study was only carried out in ‘Hass’, thus this may be an important factor, since probably if the fungi were inoculated in more varieties, differences in behavior of the advance in damage of these could be found. **Conclusions:** all the fungi showed to be pathogenic with variation in severity. In terms of *Raffaelea brunnea*, a peculiar behavior was found in the severity of internal and external damage, in which external symptoms may or may not occur, strictly in ‘Hass’ avocado plants 30 days after inoculation.

Key words: *Persea americana* Mill.; *Raffaelea brunnea*; *Ophiostoma* sp.; *Fusarium* spp.

RESUMEN

Antecedentes: recientemente en México ha surgido la preocupación por el seguimiento de los complejos ambrosiales que consisten en una relación simbiótica entre un escarabajo y un hongo, donde las hembras invaden una amplia variedad de especies haciendo galerías en la corteza y madera, en las que se reproducen y los escarabajos cultivan los

† Submitted April 30, 2021 – Accepted December 23, 2021. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

hongos para alimentarse, estos hongos pueden ser fitopatógenos causando graves daños en los árboles infectados. La proximidad de *Raffaelea lauricola* ya presente en Texas y la presencia de *Fusarium euwallacea* en el norte de México; hongos que han causado grandes pérdidas en Estados Unidos ponen en riesgo las zonas productoras de aguacate en México. Consecuentemente, el reporte de nuevos hongos asociados con complejos ambrosiales es de gran importancia.

Objetivo: realizar pruebas de patogenicidad de hongos relacionados a complejos ambrosiales en aguacate ‘Hass’.

Metodología: se utilizaron aislamientos de *Raffaelea brunnea*, *Ceratocystiopsis* sp.(pre-identificado) y *Fusarium* sp., provenientes de árboles de aguacate parasitados con escarabajos ambrosiales del estado de Michoacán y un hongo no identificado de Chiapas (México). Se realizaron inoculaciones artificiales con los hongos mediante heridas en tallo maduro y brotes del crecimiento del año (jóvenes) de plantas de ‘Hass’, y se evaluó la sintomatología y el avance del daño dentro del tallo. A tres de los aislados se les realizó un análisis de identificación molecular con la región completa del espacio transcrito interno ITS. **Resultados:** el hongo *Ceratocystiopsis* sp. fue identificado como *Ophiostoma* sp. y el *Fusarium* sp. como *Fusarium solani*, ambos aislados en Michoacán. Mientras que el hongo de Chiapas se identificó que pertenece al género *Fusarium*. Después de la inoculación destacó en patogenicidad *R. brunnea* y *Fusarium* sp., con un mayor avance dentro del tallo y daño que en algunos casos llegó hasta el tejido de médula, mostrando marchitez de hoja y manchado café rojizo en el interior del tallo. Estos dos hongos mostraron comportamiento diferencial de avance de daño conforme con el tipo de madurez del tejido, donde *Fusarium* sp. avanzó más en el tejido joven y *R. brunnea* en el maduro. **Implicaciones:** Se plantea considerar que el estudio solo se realizó en ‘Hass’, por lo que esto puede ser un factor importante, ya que probablemente si se inocularan los hongos en más variedades se podría encontrar diferencias de comportamiento del avance en daño de estos. **Conclusiones:** todos los hongos mostraron ser patogénicos con variación en severidad. En el caso de *Raffaelea brunnea* se encontró un comportamiento peculiar en la severidad del daño interno y externo, en el cual al tener daño interno puede o no presentarse síntomas externos, estrictamente en plantas de aguacate ‘Hass’ a los 30 días de inoculados.

Palabras clave: *Persea americana* Mill.; *Raffaelea brunnea*; *Ophiostoma* sp.; *Fusarium* ssp.

INTRODUCCIÓN

Nativo de Mesoamérica el aguacate (*Persea americana* Mill.) ha pasado de ser un fruto exótico a uno de los frutos más cotizados comercialmente por su valor nutricional, industrial y comercial en el ámbito mundial (Chanderbali *et al.*, 2013). En lo que fue el año 2019, se cultivó en al menos 60 países, entre estos destaca México como principal productor con 235 317 ha y una producción de 2 307 971 toneladas cosechadas (SIAP, 2020). Actualmente el principal comprador de aguacate mexicano es Estados Unidos, el 75 % de estas exportaciones provienen de México, seguido por Francia, Japón, Canadá, China y Australia (Torres, 2009). Según el SIAP (2015), la producción de aguacate en México representaba más del 30 % de la cosecha mundial, donde destacó Michoacán como primer estado productor, contribuyendo con cuatro quintas partes del total de la producción nacional; además entre los lugares emergentes de producción está el estado de Chiapas el cual se ubica en el séptimo lugar nacional en la producción de aguacate ‘Hass’, con una producción anual de casi 17 mil toneladas al año.

El cultivo del aguacate presenta alta producción, a pesar de ser fuertemente afectado por diversas plagas que limitan su comercialización local e internacional, muchas de ellas de importancia cuarentenaria. En la actualidad el seguimiento de complejos de escarabajos ambrosiales ha tomado gran importancia en el país vecino EE. UU., a causa de las pérdidas en aguacate generadas principalmente por los complejos ambrosiales *Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola* y *Euwallacea* sp.-*Fusarium euwallaceae*. Estos

complejos consisten en una relación simbiótica entre un escarabajo y un hongo. Las hembras responsables del desarrollo de las colonias fungosas invaden una amplia variedad de especies de árboles formando galerías en la corteza y madera, donde se reproducen y cultivan distintos tipos de hongos para alimentar a las larvas y adultos. En ocasiones estos hongos pueden ser fitopatógenos y causar graves daños a los árboles invadidos (Eskalen *et al.*, 2013). Por la gran cercanía de la presencia de estos patógenos en territorio estadounidense ha surgido un gran interés en el estudio y seguimiento de estos complejos ambrosiales en México. Por otro lado, se tiene un gran interés en el hongo *F. euwallacea* y su vector *Euwallacea* sp. (Eskalen *et al.*, 2013); ya que esta asociación provoca la enfermedad conocida como “muerte descendente por *Fusarium* en aguacate” y otras lauráceas. Esta enfermedad, primeramente, se encontraba causando estragos en California, EE. UU. y para el año 2016 se reportó por primera vez la presencia del vector *Euwallacea nr. fornicatus* en una trampa en Tijuana, México (García-Ávila *et al.*, 2016).

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron obtenidas en Ario de Rosales y Cutzato, Michoacán, y la región de Lázaro Cárdenas del municipio de Trinitaria, Chiapas. Las muestras de Cutzato, Michoacán provinieron de madera dañada de un árbol de aguacate que sufrió marchitez donde se identificó al escarabajo *Xyleborus affinis* y de donde se aisló del árbol afectado *Fusarium* sp. También fueron identificados dos escarabajos en madera afectada, *Monarthrum conversum* del cual se aisló *Ceratostylopsis* sp. (identificación inicial) de sus micangias, y de *M. exornatum* del que se aisló *Raffaelea brunnea* (L.R. Batra) T.C. Harr. a partir de sus micangias. Dichas muestras de hongos fueron resultado del estudio de Ángel-Restrepo *et al.* (2019) y fueron proporcionados por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio coautor de la presente investigación.

Para el caso del hongo no identificado de la región de Lázaro Cárdenas del municipio de Trinitaria, Chiapas, se recolectaron muestras de ramas de aguacate 'Hass' afectadas (5 cm de diámetro y 10 cm de largo) fueron colocadas en recipientes plásticos de color oscuro para evitar cualquier interferencia con la luz y cerrados en tapa hermética como lo describe Carrillo *et al.* (2012). El árbol afectado fue parasitado por el escarabajo *Microcorthylus vesus* Wood identificado por el Dr. Thomas H. Atkinson de la Texas A&M University con las claves de Wood (1982, 1986a, 1986b), y el hongo se aisló un a partir de madera afectada.

Incremento de hongos

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

Identificación molecular de los hongos

A partir de cultivos puros que se dejaron de 7 a 14 días de crecimiento en PDA y CSMA se extrajo micelio aéreo con espátula, posteriormente se maceró en un mortero de porcelana estéril al cual se le adicionó nitrógeno líquido gradualmente. Se depositó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml conteniendo 500 µL de buffer de extracción (Meyerowitz, 1989), se expuso a 45 °C durante 30 minutos mezclando por inversión cada 5 minutos. Se agregaron 30 µL de CTAB al 10 % y 70 µL de cloruro de sodio a 5 M y se colocó a 65 °C

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

La región completa del espacio transcrito interno (ITS4) se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se llevó a cabo en un termociclador BIORAD® (EE. UU.), con una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en agarosa al 1 %. El gel se analizó en un transiluminador GelDoc-It™ 300 UVP (Inglaterra). Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (Corea) las secuencias obtenidas fueron editadas y ensambladas con el programa Geneious® 9.1.5 (<https://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012). Las secuencias resultantes fueron alineadas y comparadas en homología (99-100 %) con secuencias de la base de datos del banco de genes (NCBI GenBank) utilizando el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Se realizó para la muestra perteneciente a Chiapas una alineación de secuencias con muscle v3.8.31, posteriormente se buscó el modelo que mejor se ajustó a los datos acorde a MEGA 7 el cual fue el modelo de sustitución nucleotídica de Kimura de dos parámetros. Después se realizó una filogenia con el método de máxima verosimilitud con 1000 réplicas de remuestreo ("bootstrap").

Descripción morfológica de los hongos

La descripción morfológica se basó en características macroscópicas en medio PDA y características microscópicas en medio CLA. Los términos utilizados, así como las estructuras que se describieron se hicieron de acuerdo con lo sugerido por Leslie *et al.* (2006) para *Fusarium*; Brasier y Mehrota (1995) para *Ophiostoma*; Batra (1967), Cassar y Blackwell (1996) para *Raffaelea* (*Ambrosiella*).

Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en 28 plantas de aguacate de un año y medio, injertadas con el cv. Hass sobre portainjertos de la raza mexicana y con una altura aproximada de 1.20 m, las cuales se inocularon, y mantuvieron bajo condiciones de invernadero en Chapingo, Texcoco, Estado de México. Se realizaron cuatro repeticiones por cada hongo a inocular; una planta por repetición. La inoculación se realizó en dos puntos de crecimiento, en la base cercana al injerto (maduro) y en un brote (joven). Se realizó un corte con navaja esterilizada de 5 mm en el tallo, se colocó un disco micelial de 0.5 cm de diámetro de PDA o CSMA con micelio acorde a cada uno de los hongos a inocular, posteriormente se cubrió con una capa de parafilm. A las plantas testigo se les produjeron heridas iguales y se les asperjó agua estéril. Posteriormente las plantas se colocaron en cámara húmeda manteniendo 72 horas de humedad relativa mayor o igual al 80 % para promover la penetración exitosa del hongo. Se realizaron evaluaciones cada semana durante 1 mes para determinar el desarrollo de la enfermedad y registrar presencia y ausencia de alguna sintomatología. Un mes posterior a la inoculación realizó una evaluación destructiva en la cual se realizaron cortes longitudinales en el tallo para cuantificar el avance de la enfermedad en xilema y determinar la presencia de daños en otros tejidos. Esta determinación se realizó midiendo la longitud de avance de la lesión hacia arriba y hacia abajo a partir del punto de inoculación.

Con los datos obtenidos del avance de la enfermedad se realizaron análisis de varianza y las medias fueron separadas de acuerdo con la prueba de Fisher (DMS) a una $P=0.05$.

Re-aislamiento del patógeno

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

RESULTADOS

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

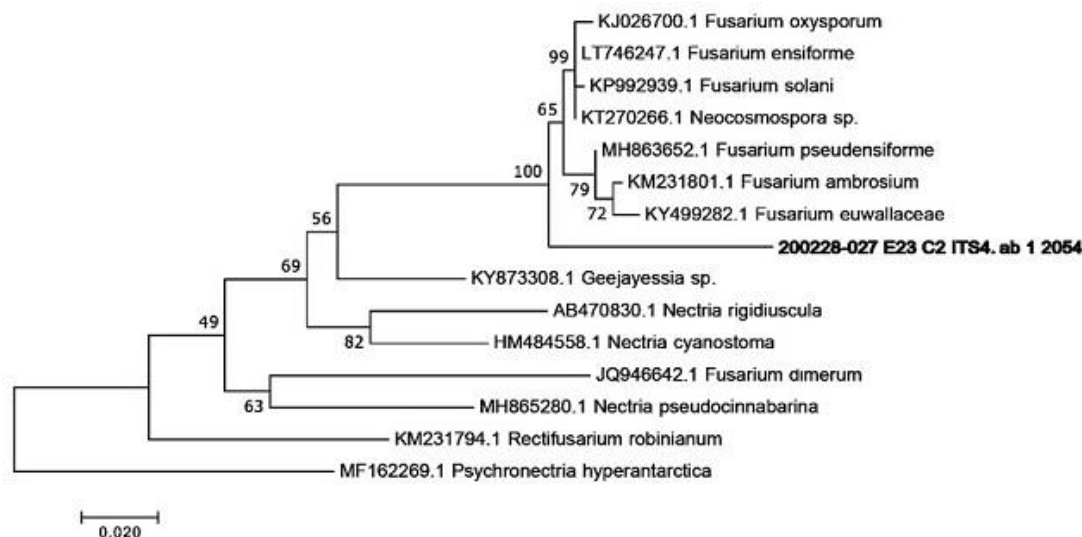


Figura 1. Árbol del mejor modelo Kimura-2P x ML de la alineación de la secuencia (ITS) del hongo proveniente de La Trinitaria, Chiapas asociado al barrenador ambrosial *Microcorthylus vescus* Wood. La barra de escala muestra 0.02 sustituciones por sitio, los valores de “bootstrap” de 1000 réplicas se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

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

Respecto a la muestra perteneciente al estado de Chiapas, la cual en BLAST mostró una mayor similitud con una secuencia sometida del 23 % con un valor de error de $2e-17$ y un porcentaje de identidad similar del 93.70 % a la muestra con el identificador MK595413.1 perteneciente a *F. solani*. Otras de las secuencias sugeridas con Megablast fueron *F. oxysporum*, *Neonectria* sp., *Fusarium* sp. (FSSC) y *Necosmospora* sp. Dado la relativa baja similitud se procedió a realizar la construcción de una filogenia (Figura 1), la cual se basó en el DNA (ITS), el árbol se generó a partir de especies del género *Fusarium*, y otros miembros de la familia Nectricaceae según la publicación Lombard *et al.* (2015) y de la familia Tilachlidiaceae. En el árbol del análisis filogenético se observó una distinción clara con las otras especies de *Fusarium* y cuya ramificación tiene 100 % de certeza (Figura 1).

Cabe mencionar que la identificación de *R. brunnea* no fue realizada ya que estaba previamente identificada.

Los hongos originarios de Michoacán fueron agrupados por su morfología, en el caso de *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), fueron separados en cinco colonias diferentes con características similares ya que la morfología del crecimiento variaba en forma y color (Tabla 1). *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), fue separado en cinco colonias a las cuales se les asignó el siguiente nombre para diferenciarlas Ce1, Ce2, Ce3, Ce4 y Ce5. Por otro lado, en el caso de *F. solani* y *R. brunnea* solo se consideró una misma colonia ya que la morfología que se mostró en varias de las cajas fue recurrente (Tabla 1), sin encontrar alguna diferencia de color o forma de crecimiento. En el caso de Chiapas sólo se logró conservar una colonia de hongo perteneciente a *Fusarium* sp., la cual mostró únicamente un tipo de colonia (Tabla 1).

En las pruebas de patogenicidad realizadas en las distintas colonias de *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp) se pudo observar que Ce1 tras la inoculación y las 72 horas de mantenerse en cámara húmeda mostró la aparición de un poco de polvo granuloso blanco en la zona de la herida el quinto día posterior al procedimiento, Ce2 tuvo presencia de polvo granuloso ligeramente amarillento en la zona de la herida al quinto día posterior al procedimiento, y al séptimo día

se pudo observar que los pequeños brotes presentaban síntomas de marchitez.

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

Ce4 tras el quinto día después de la inoculación mostró polvo amarillento granuloso en la zona de la herida (Figura 2-7b) y posteriormente a los 20 días presentó marchitez en las puntas de las hojas (Figura 3-7a).

En el caso de Ce3 y Ce5 no mostró una sintomatología externa significativa más que la presencia de polvo blanquecino, pero en menor cantidad que en los otros casos desde el 5 día posterior a la inoculación y marchitez muy ligera en una planta de Ce5 a partir del día 20. En los testigos no se observó ningún tipo de sintomatología, y una ausencia de crecimiento de micelio.

Se realizaron re-aislamientos de estas colonias y se obtuvieron 100 % en el caso de Ce1 y Ce2, 75 % en el caso de Ce3 y un 50 % en el caso de Ce4 y Ce5.

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

R. brunnea, al tercer día tras ser inoculado presentó indicios de polvo granuloso blanco, el cual al quinto día mostró un crecimiento más abundante en la zona de la herida, desarrollándose en la superficie de la herida en forma de domo (Figura 2-3b), al décimo día se pudo empezar a observar una cicatrización necrótica, con presencia de polvillo negro (Figura 2-3b). A los 15 días algunas de las plantas presentaron marchitez en el ápice de las hojas, el cual avanzó hacia el interior de estas (Figura 3-3a). El re-aislamiento fue de 60 %, su desarrollo en medio CSMA fue de 1 a 2 semanas.

Tabla 1. Descripción morfológica de hongos aislados asociados a escarabajos ambrosiales en aguacate de Michoacán de Ocampo y Chiapas, México.

Código	Macroconidia	Conidia	Ascospora	Microconidia	Clamidospora	Peritecio	Blastoporo	Conidióforo	Colonia
<i>Raffaelea brunnea</i>	-	-	Alargado parecido a una levadura	-	-	-	Solitario, pared gruesa, terminal globosa	Aleuroconidio, simpodial, ramificado, conidio solitario terminal	Micelio de textura granulosa a flocosa, borde crema y blanco, hacia el centro se torna color verde oscuro con una ligera tonalidad café con múltiples anillos. En el reverso tonalidad crema en los bordes a un color café. Con el tiempo se torna todo de un color café intenso.
<i>Fusarium sp.</i>	Alargado, ligeramente curvado, aseptado, ancho	-	-	Abundantes, oval, ovoide y fusiforme aseptados	Obscuras, pared gruesa, terminal e intercalar	-	-	Corto y no ramificado	Micelio de textura algodonosa a flocosa con anillos (7) no tan definidos. El micelio se torna más denso en cuanto más se acerca al centro, el micelio es de color amarillento-blanco. En el reverso se puede ver un tono blanco-amarillento.
<i>Fusarium solani</i>	Alargados, ligeramente curvados, aseptados, delgados	-	-	Abundantes, oval y ovoide. 0-1 septos dispuesto en falsas cabezas	Obscuras, pared grosor medio, terminal	-	-	Corto y no ramificado	Micelio de textura algodonosa a flocosa se logran percibir múltiples anillos muy definidos (6), su coloración es de un amarillento claro, en el reverso blanco-amarillento.
<i>Ophiostoma sp. (Ce1)</i>	-	Ovoides y globosas	Hialinas, unicelulares	-	-	Marrón oscuro, forma de botella, largo	-	Ramificado y largo	El micelio es algodonoso a flocoso. hacia el centro se torna un poco más oscuro, muestra una coloración desde blanco a amarillento. Múltiples anillos de los cuales no hay mucha separación, ligeramente definidos. En la parte reversa coloración café-con tonos violáceos y rojizos que se extienden del centro hacia afuera de algunos sitios del micelio de una forma no uniforme.
<i>Ophiostoma sp. (Ce2)</i>	-	Ovoides	Hialinas, unicelulares	-	-	Marrón oscuro, forma de botella, largo	-	Ramificado y largo	Textura algodonosa a flocosa en el micelio, coloraciones de blanco al amarillento. Anillo central ancho y múltiples más delgados que lo rodean, este primero es más denso que los otros. Por la parte reversa se nota coloración blanca-amarillenta.

Código	Macroconidia	Conidia	Ascospora	Microconidia	Clamidospora	Peritecio	Blastoporo	Conidióforo	Colonia
<i>Ophiostoma</i> sp. (Ce3)	-	Ovoide y globosas	Hialinas, unicelulares	-	-	Marrón oscuro, forma de botella, largo	-	Ramificado y largo	Textura algodonosa a flocosa, con coloraciones blanco-amarillento a unos tonos ligeramente naranjas tenues. Anillo central ancho y múltiples más delgados que lo rodean. Por la parte reversa se nota coloración blanca-amarillenta con ligeros tonos naranjas-cafés muy tenues.
<i>Ophiostoma</i> sp. (Ce4)	-	Ovoide	Hialinas, unicelulares	-	-	Marrón oscuro, forma de botella, largo	-	Ramificado Y largo	Textura algodonosa a flocosa, con coloraciones que van de blanco a amarillento. Se puede ver un anillo central irregular ancho y múltiples irregulares más delgados que lo rodean. Por la parte reversa se nota coloración blanca-amarillenta.
<i>Ophiostoma</i> sp. (Ce5)	-	Ovoides	Hialinas, unicelulares	.	-	Marrón oscuro, forma de botella, largo	-	Ramificado y largo	Textura mucosa, con coloraciones de blanco a amarillento, dos anillos con bordes irregulares. En la parte reversa una coloración blanca-amarillenta.



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

Fusarium sp., mostró tras los 5 días posteriores a su inoculación la presencia de un poco de polvo granuloso blanco al igual que exudados de azúcares. A los 7 días empezó a mostrar marchitez desde el ápice y avanzó en el margen de éstas. Para el día 20 algunas hojas mostraron una marchitez más pronunciada de un color café claro, que en algunos casos tendía a un tono violáceo, llegando hasta un tercio de la hoja (Figura. 3-2a), y la herida de inoculación mostraba aún polvo blanco (Figura 2-2b). El re-aislamiento fue de 90 %.

En cuanto a las mediciones del avance longitudinal del daño de los hongos en lo que fueron las inoculaciones en brote maduro, cabe destacar que *R. brunnea* presentó diferencias significativas con *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce1 y *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.) Ce3 (Figura 4) y fue el que tuvo más avance con un promedio de 23.47 mm, seguido por Ce1 con 13.05 mm y *Fusarium* sp., con 12.24 mm. Seguidos, respectivamente, por *F. solani*, Ce5, Ce2, Ce4 y Ce3. Por estas características en el avance en

brote maduro de los tres primeros, estos podrían causar más daño en plantas de una edad más avanzada. Los daños encontrados en la corteza mostraron, por otra parte, coloraciones color café rojizo que van marcando el avance distintivo tras los cortes longitudinales del tallo (Figura 3).

Respecto al análisis de separación de medias (Figura 5) del avance del daño en brote tierno se observó diferencia significativa de *Fusarium* sp. con *Ophiostoma* sp. Ce3, siendo mayor el avance en

Fusarium sp. con 14.93 mm, *Ophiostoma* sp. Ce1 con 13.09 mm, *Ophiostoma* sp. Ce2 con 12.63 mm, y *F. solani*, con 11.03 mm, seguidos por *R. brunnea*, *Ophiostoma* sp. Ce4, *Ophiostoma* sp. Ce5 y *Ophiostoma* sp. Ce3. El avance en brote tierno sugiere que plantas más jóvenes podrían ser más susceptibles a estos patógenos y la parte de las ramas más jóvenes o la parte superior del tallo. La coloración de un café rojizo es la que distintivamente marca el avance de la enfermedad tanto hacia arriba como hacia abajo de las heridas de inoculación (Figura 3).



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

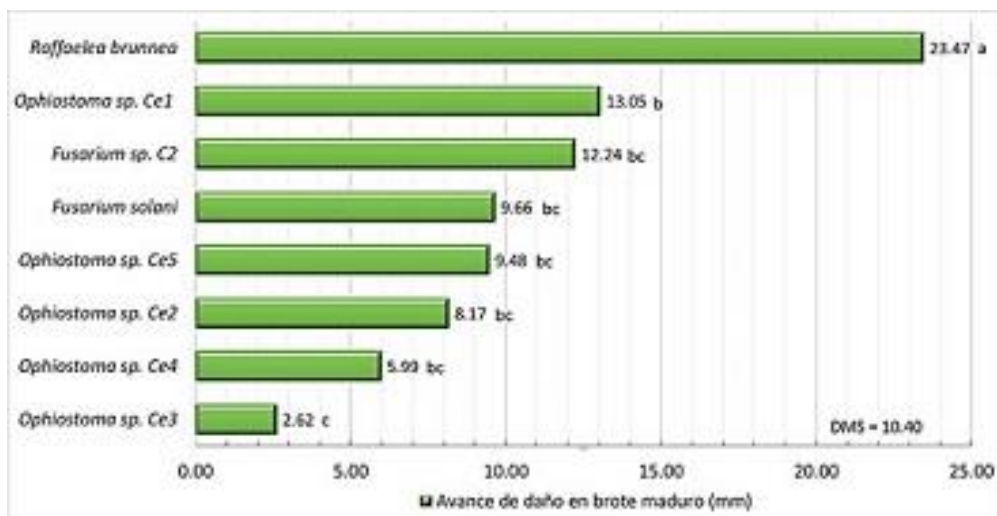


Figura 4. Amplitud longitudinal del daño por hongos asociados a barrenadores ambrosiales en brote maduro de aguacate ‘Hass’. Letras distintas significan diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher (DMS) a una $P=0.05$.

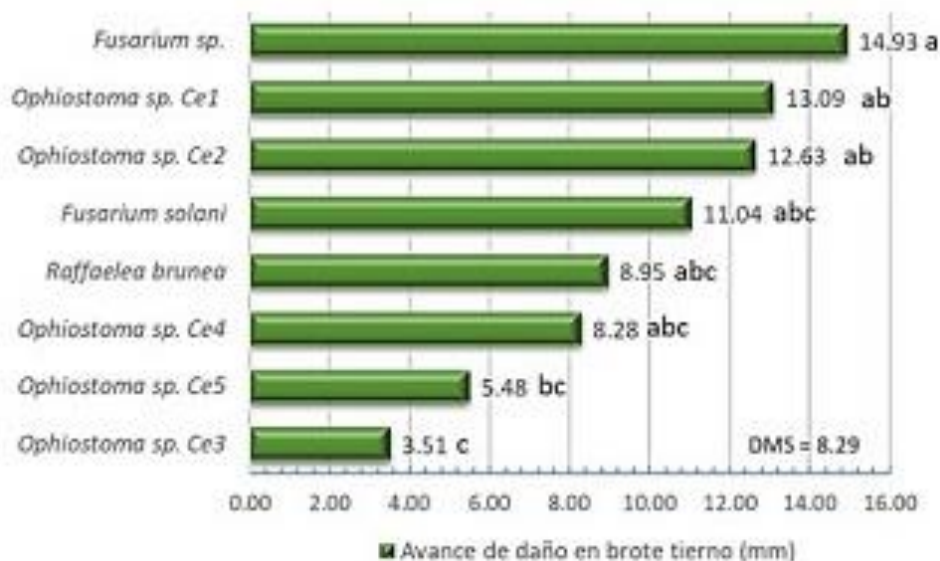


Figura 5. Amplitud longitudinal del daño por hongos asociados a barrenadores ambrosiales en brote tierno de aguacate ‘Hass’. Letras distintas significan diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher (DMS) a una $P=0.05$.

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

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

el daño en xilema y floema es primordial en la presencia de los síntomas.

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

DISCUSIÓN

En el caso de los resultados obtenidos en Blast con relación a *Ophiostoma* sp. se pudo constatar que entre el género *Ceratocystiopsis* y *Ophiostoma* se encuentran muy pocas diferencias llegándose a sugerir

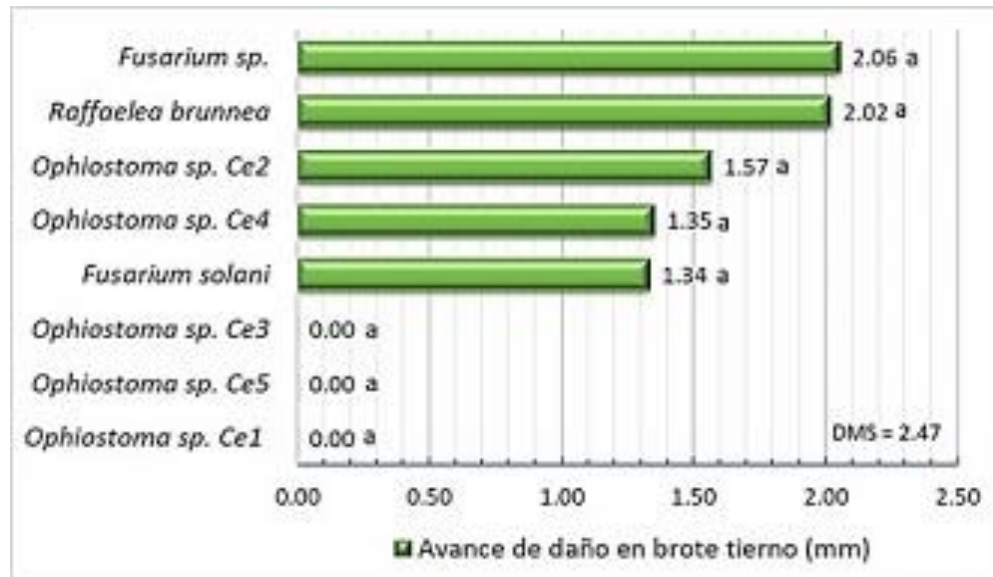


Figura 6. Avance transversal del daño de los hongos dentro del tallo de aguacate 'Hass'. Letras distintas significan diferencias entre medias de acuerdo con la prueba de Fisher (DMS) a una $P=0.05$.

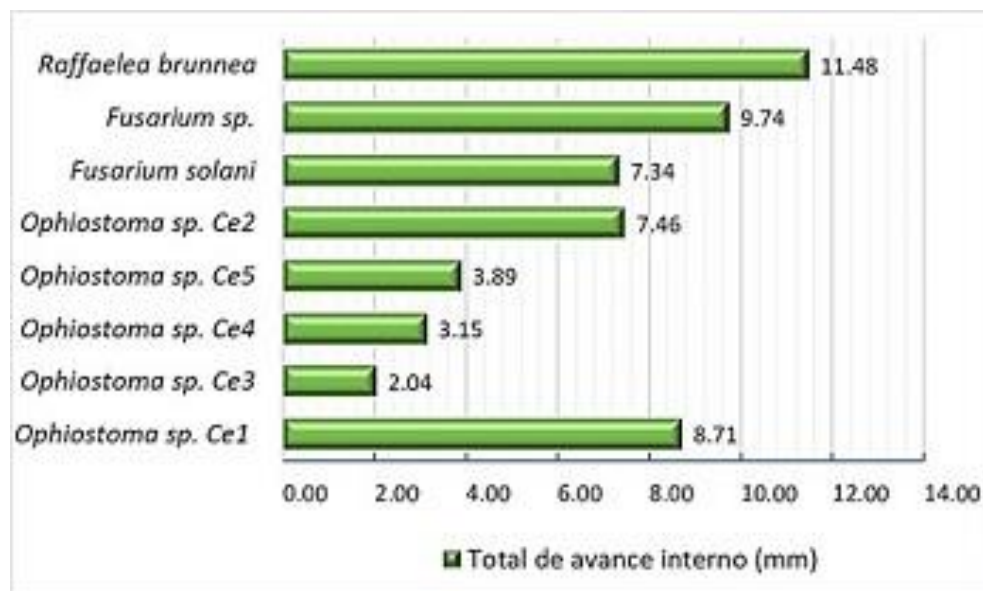


Figura 7. Avance promedio total del daño interno de los tipos de brote y los tipos de daño de los hongos en aguacate 'Hass'.

una sinonimia entre los dos géneros, como argumentó Wingfield (1993), que mencionó que no es lógico mantener a *Ceratocystiopsis* como un género diferente, basado en que *Ophiostoma* tiene como distinción morfológica múltiples formas de ascosporas, siendo esta divergencia solo una de muchas características para hacer subdivisiones en el género. Por lo que posteriormente se sugiere el realizar una sinonimia entre estos dos géneros, una identificación morfológica más a fondo ya que la principal diferencia reside en que *Ophiostoma* tiene una gran variedad de ascosporas con distinta morfología (Hausner *et al.*, 1993) y se procedió formalmente a reducir a *Ceratocystiopsis* como una sinonimia de *Ophiostoma*, basado en secuencias SSU y LSU rDNA.

Respecto a *Fusarium* sp. (C2) de Chiapas se pudo observar que divergió de las especies de *Fusarium* presentes en la filogenia. Por lo que se sugiere realizar más estudios para obtener una información más precisa sobre su filogenia e identidad. Cabe mencionar que las especies pertenecientes a *Nectriaceae* son conocidos por ser responsables de enfermedades en plantas de aguacate (Parkinson *et al.*, 2017, Vitale *et al.*, 2012), e incluyen dentro de ella varios miembros del género *Fusarium* y similares a este, como *Neocosmospora* (Farr y Rossman 2018).

En lo que respecta a *Ophiostoma* sp. la cepa Cel destacó con un avance sobresaliente en los brotes tiernos y maduros, pero no se mostraron daños que llegaran hasta la médula a diferencia de otra de las dos colonias C3 y C4 que mostraron daño en médula. Generalmente los hongos pertenecientes al género *Ceratocystiopsis* (*Ophiostoma*) causan daños en pinos, lo cual fue reportado en Inglaterra (Winfield y Gibbs, 1991). Se ha mencionado también que puede llegar a causar manchado de la madera (Zhou *et al.*, 2001), tal como se pudo observar en los tallos donde el manchado marca el avance del daño causado por el hongo en ambos tipos de brotes en xilema y floema. La información respecto de este hongo es bastante reducida por lo que los aportes nuevos acerca de este son de gran importancia, y más en aguacate.

F. solani, mostró a los 5 días de ser inoculado polvo granuloso blanco y en partes amarillento similar a lo que mencionaron Ceja *et al.* (2000) en el caso de *F. oxysporum* y *F. solani* donde la inoculación artificial en el tallo de plántulas de aguacate mostró una necrosis tenue con polvo granuloso blanco, e indicaron que también ese síntoma externo coincide con lo que llegaron a observar en campo. También a diferencia de *F. oxysporum* y *F. solani* donde se mencionó que estos únicamente provocaron pequeñas lesiones de color rojizo bajo la corteza que no se extendieron ni profundizaron hacia el cilindro central, en este estudio para la cepa de *F. solani*, se pudo observar como si existió daño en floema, xilema, y en algunos casos

hasta la médula. Como se mencionó previamente al séptimo día se pudieron observar exudados de azúcares provenientes de las lesiones de inoculación acompañadas de polvo blanco que se distribuía a lo largo de esta secreción, similar al caso de árboles parasitados por *F. euwallacea*, donde se ha mencionado que los aguacates infestados exhiben depósitos de polvo blanco y exudados compuestos de perseitol alrededor de la herida de entrada del barrenador (Mendel *et al.*, 2012). Aunque se pudo observar un manchado en la corteza y una sintomatología característica, *F. solani* no resultó ser de los más patogénicos, sin embargo, se considera que una evaluación en árboles mayores y un experimento de mayor duración puede generar diferentes resultados.

En lo que se refiere a *R. brunnea* se pudo observar sintomatología en hojas sin daño extensivo superficial en tallo o brote, dichas observaciones son similares a las reportadas por Ploetz *et al.* (2012) en *R. lauricola* donde se realizaron pruebas de patogenicidad en variedades de aguacate, donde señalaron que el primer síntoma de la marchitez del laurel es marchitez en las hojas cambiando de un color de un verde olivo a un café. La coloración de los daños se mostró en un color café oscuro en parches o rayas como sintomatología externa y un color café rojizo de manera interna contrastando con la corteza. También se pudo observar que la sintomatología interna y externa estaba relacionada, pero en algunos casos donde había una severidad vascular mayor se desarrollaba una sintomatología externa menor. Con esto se puede indicar que el comportamiento ente *R. brunnea* y *R. lauricola* es similar en cuánto a sintomatología externa e interna y, sobre todo, que la relación entre ellas no necesariamente pareciera estar ligada de manera estricta, donde en el caso de haber daño interno puede o no presentarse síntomas externos, pero no presentarse una sintomatología sin un daño interno. Lo cual puede ser debido a que se sobrepasa la resistencia de la planta ante la enfermedad, cuando esto sucede los síntomas externos comienzan a presentarse, causando ocasionalmente muertes súbitas e inesperadas. Siendo esto último, lo más peligroso para el productor, ya que la enfermedad y su severidad de la enfermedad podría pasar en ocasiones desapercibidas. Cabe indicar que de acuerdo con el árbol filogenético de *R. sensu stricto*, se divide en dos, *R. brunnea* y *R. lauricola* que están en la misma rama, o sea más relacionadas (Dreaden *et al.*, 2014).

En lo que respecta al hongo procedente de Chiapas, *Fusarium* sp., se encontró polvo blanquecino emanado del punto de inoculación y en las heridas dentro del tallo color café rojizo similar a lo encontrado por Guarnaccia *et al.* (2008) en Sicilia, Italia, donde encontraron lesiones en la corteza de aguacate similar a un cancro, con exudados de azúcares en la superficie

y por dentro del tallo un color café rojizo, esto en el nuevo hongo que proponen *Neocosmospora perseae*. En lo que respecta a las evaluaciones realizadas con *Fusarium* sp., fue el segundo en tener más avance en el tallo y daño, el cual llegó hasta la médula deteriorando varios tejidos. Esto último puede explicar la sintomatología de marchitez que se encontró aproximadamente desde los 7 días y que fue avanzando gradualmente. En campo, en árboles adultos de aguacate 'Hass' este hongo afecta ramas jóvenes de uno a dos años y avanza regresivamente (Figura 8) e inclusive llegando al tronco y eventualmente secando todo el árbol.



Figura 8. Muerte regresiva de brotes jóvenes de aguacate 'Hass' causados por *Fusarium* sp. asociado a *Microcorythylus vesus* Wood en la Trinitaria, Chiapas.

Por otra parte, se debe de tomar en cuenta que los estudios solo se realizaron en una variedad de aguacate ('Hass'), por lo que esto puede ser un factor importante, ya que probablemente si se probaran los hongos en más variedades se podría encontrar más diferencias en el comportamiento del avance de los

hongos. También cabe recalcar que el estudio se realizó bajo condiciones de invernadero, donde las plantas y hongos no se expusieron a los cambios ambientales ni interacciones con otros organismos, lo cual pudo influir significativamente en los resultados.

Para obtener resultados más precisos se sugiere el uso de árboles con una edad mayor (por lo menos de dos años) y más repeticiones para obtener resultados con una mayor sensibilidad. Un experimento en campo sería lo más adecuado, donde se pudiese evaluar el daño generado por la constante interacción de los escarabajos con los hongos. Una evaluación con mayor duración podría proporcionar más datos, ya que el avance de los hongos a mayor tiempo puede producir mayores daños y sintomatología diferente.

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

CONCLUSIONES

R. brunnea, *Fusarium* sp., *Ophiostoma* sp. (*Ceratocystiopsis* sp.), y *F. solani*, son considerados patogénicos para aguacate de acuerdo con los daños observados, en brote maduro y brote tierno de las plantas inoculadas.

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

Declaraciones

Conflict of interests. There is no conflict of interest for the publication of this research.

Funding. CONACYT-México is thanked for the scholarship for Master of Science studies.

Compliance with ethical standards. Due to the nature of the study, no standards were applied national or international ethics and bioethics.

Data availability. The data is available upon request at abarrien@correo.chapingo.mx with Dr. Alejandro F. Barrientos Priego.

Author contribution statement (CRedi). **A. Barrientos-Martínez** – Conceptualization, Investigation, Formal analysis, **S. G. Leyva Mir** – Conceptualization, Formal analysis, **M. Vargas Hernández** – Data curation, formal analysis., **M. Camacho Tapia** – Investigation, **S. Ochoa Ascencio** - Investigation, Methodology., **E. Acuayte-Valdés** - Methodology, **J. R. Bermúdez-Barrientos** – Formal Analysis, **A. F. Barrientos-Priego** – Conceptualization, Investigation, formal analysis.

REFERENCIAS

- Ángel-Restrepo, M., Ochoa-Ascencio, S., Fernández-Pavía, S., Vázquez-Marrufo, G., Equihua-Martínez, A., Barrientos-Priego, A., F., Correa-Suarez, M. and Saucedo-Carabez, J.R., 2019. Identificación de escarabajos ambrosiales (Coleópteros: Curculionidae) asociados a árboles de aguacate en Michoacán, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 5(2), pp. 80-88.
- Batra, L.R., 1967. Ambrosia fungi: a taxonomic revision, and nutritional studies of some species. *Mycologia*, 59(6), pp. 976-1017. <https://doi.org/10.1080/00275514.1967.12018485>
- Brasier, C.M. and Mehrota, M.D., 1995. *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov. a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. *Mycology Research*, 99, pp. 205-215. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80887-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80887-3)
- Carrillo D., Duncan R. and Peña J.E., 2012. Ambrosia beetles (Curculionidae: Scolytinae) that breed in avocado wood in Florida. *Florida Entomology*, 95, pp. 573–579. <https://doi.org/10.1653/024.095.0306>.
- Cassar, S. and Blackwell, M., 1996. Convergent origins of ambrosia fungi. *Mycologia*, 88(4), pp. 596-601. <https://doi.org/10.1080/00275514.1996.12026690>
- Ceja Torres, L.F., Téliz Ortiz, D., Osada Kawasoe, S. and Morales García, J. L., 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill. En cuatro municipios del estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2), pp. 79-86.
- Chanderbali, A.S., Soltis, D.E., Soltis, P. S. and Wolstenholme, B.N., 2013. Taxonomy and Botany. In: B. A. Schaffer, B. N. Wolstenholme and A. W. Whaley, eds. *The Avocado: Botany, Production and Uses*, 2nd ed., Oxfordshire: CAB International. pp. 31-50. <https://doi.org/10.1079/9781845937010.0000>
- Dreaden, T.J., Davis, J.M., De Beer, Z.W., Ploetz, R.C., Soltis, P.S., Wingfield, M.J. and Smith, J.A., 2014. Phylogeny of ambrosia beetle symbionts in the genus *Raffaelea*. *Fungal Biology*, 118(12), pp. 970-978. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.09.001>
- Eskalen, A., Stouthamer, R., Lynch, S.C., Rugman-Jones, P.F., Twizeyimana, M., Gonzalez, A. and Thibault, T., 2013. Host range of *Fusarium dieback* and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytinae) vector in southern California. *Plant Disease*, 97(7), pp. 938-951. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1026-RE>
- Farr, D.F. and Rossman A.Y., 2018. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases>. Consultado 5 de febrero, 2018.
- García-Avila, C.D.J., Trujillo-Arriaga, F.J., López-Buenfil, J.A., González-Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L.F., Ruiz-Galván, I., Quezada-Salinas, A. and Acevedo-Reyes, N., 2016. First report of *Euwallacea* nr. *formicatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist*, 99(3), pp. 555-556. <https://doi.org/10.1653/024.099.0335>
- Guarnaccia, V., Sandoval-Denis, M., Aiello, D., Polizzi, G. and Crous, P.W., 2018. *Neocosmospora perseae* sp. nov., causing trunk cankers on avocado in Italy. *Fungal Systematics and Evolution*, 1(1), pp. 131-140. <https://doi.org/10.3114/fuse.2018.01.06>
- Harrington, T.C., 1981. Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. *Mycologia*, 73, pp. 1123–1129. <https://doi.org/10.2307/3759682>
- Harrington, T.C., Yun, H.Y., Lu, S.S., Goto, H., Aghayeva, D.N. and Fraedrich, S.W., 2011. Isolations from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*, confirm that the laurel wilt pathogen, *Raffaelea lauricola*, originated in Asia. *Mycologia*, 103(5), pp. 1028-1036. <https://doi.org/10.3852/10-417>
- Hausner, G., Reid, J. and Klassen, G. R., 1993. *Ceratocystopsis*: a reappraisal based on molecular criteria. *Mycological Research*, 97(5), pp. 625-633. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81188-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81188-X)
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C. and Thierer, T., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data.

- Bioinformatics*, 28(12), pp. 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. and Bullock, S., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames: Blackwell Publishing. 388 p.
- Lombard, L., Van der Merwe, N.A., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W., 2015. Generic concepts in Nectriaceae. *Studies in Mycology*, 80, pp. 189-245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>
- Mendel, Z., Protasov, A., Sharon, M., Zveibil, A., Yehuda, S.B., O'Donnell, K., Rabaglia, R., Wysoki, M. and Freeman, S., 2012. An Asian ambrosia beetle *Euwallacea fornicatus* and its novel symbiotic fungus *Fusarium* sp. pose a serious threat to the Israeli avocado industry. *Phytoparasitica*, 40(3), pp. 235-238. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0223-7>
- Meyerowitz, E.M., 1989. Arabidopsis, a useful weed. *Cell*, 56, pp. 263-269. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90900-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90900-8)
- Torres Preciado, V.H., 2009. La competitividad del aguacate mexicano en el mercado estadounidense. *Revista de Geografía Agrícola*, 43, pp. 61-79.
- Parkinson, L.E., Shivas, R.G. and Dann, E.K., 2017. Pathogenicity of nectriaceous fungi on avocado in Australia. *Phytopathology*, 107, pp. 1479-1485. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0084-R>
- Ploetz, R.C., Pérez-Martínez, J.M., Smith, J.A., Hughes, M., Dreaden, T.J., Inch, S.A. and Fu, Y., 2012. Responses of avocado to laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*. *Plant Pathology*, 61(4), pp. 801-808. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02564.x>
- SIAP, 2015. Anuario estadístico de producción agrícola, cierre de la producción agrícola por cultivo. Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México, México.
- <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>. Consultado 10 de febrero 2019.
- SIAP, 2020. Anuario estadístico de producción agrícola, cierre de la producción agrícola por cultivo. Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México, México. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo>. Consultado 6 de abril 2021.
- Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G. and Polizzi, G., 2012. First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160(3), pp. 156-159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2011.01869.x>
- Wingfield, M.J., 1993. Problems in delineating the genus *Ceratocystiopsis*. In: M. J. Wingfield, K. A. Seifert and J. Webber, eds. *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*. St. Paul: American Phytopathological Society. pp., 21-26.
- Wingfield, M.J. and Gibbs, J.N., 1991. *Leptographium* and *Graphium* species associated with pine infesting bark beetles in England. *Mycological Research*, 95(11), pp. 1257-1260. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80570-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80570-4)
- Wood, S.L., 1982. The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. *Great Basin Naturalist Memoirs*, 6, pp. 1-1359.
- Wood, S.L., 1986a. A reclassification of the genera Scolytidae (Coleoptera). *Great Basin Naturalist Memoirs*, 10, pp. 1-126.
- Wood, S.L., 1986b. New synonymy and new species of American bark beetles (Coleoptera: Scolytidae), part XI. *Great Basin Naturalist Memoirs*, 46, pp. 265-273.
- Zhou, X., De Beer, Z., Wingfield, B. and Wingfield, M., 2001. Ophiostomatoid fungi associated with three pine-infesting bark beetles in South Africa. *Sydowia*, 53, pp. 290-300.