

# First report of *Clonostachys rosea* associated with avocado fruit rot in Puebla, Mexico

## Primer reporte de *Clonostachys rosea* asociado a la pudrición del fruto de aguacate en Puebla, México

Wendy Abril Coyotl-Pérez, Omar Romero-Arenas, Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Pedro Zacachimalpa, 72960, Puebla, México; Clemente Mosso-González, CONACyT-Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP), 4a. Av. Nte. esquina 19, Norte, Centro, CP 30700 Tapachula, Chiapas, México; Yesenia Pacheco-Hernández, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, Km 9.6 Carretera Irapuato-León, CP 36824, Irapuato, Guanajuato, México; José Antonio Rivera-Tapia, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria. C.P. 72570, Puebla, México; Nemesio Villa-Ruano\*, CONACyT-Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología.

\*Corresponding author: [necho82@yahoo.com.mx](mailto:necho82@yahoo.com.mx); [nemesio.villa@conacyt.mx](mailto:nemesio.villa@conacyt.mx)

Received: March 18, 2021.

Accepted: April 22, 2022.

Coyotl-Pérez WA, Romero-Arenas O, Mosso-González C, Pacheco-Hernández Y, Rivera-Tapia JA and Villa-Ruano N. 2022. First report of *Clonostachys rosea* associated with avocado fruit rot in Puebla, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 298-307.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2203-5>

Primera publicación DOI: 26 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 26, 2022.

**Abstract.** The northern highlands of Puebla are considered a new potential area for the cultivation of Hass avocado. Then, the emergence of new phytopathogens related to this geographical area is latent. The aim of this investigation was to isolate the microorganisms linked to the avocado fruit rot recently recorded by the producers of this locality

**Resumen.** La sierra norte de Puebla se considera una nueva zona potencial para el cultivo del aguacate Hass. Debido a este motivo, la emergencia de nuevos fitopatógenos aliados a esta zona geográfica queda latente. El objetivo de esta investigación fue aislar los microorganismos asociados a la pudrición del fruto del aguacate reportado recientemente por los productores de esta localidad en el año 2021. La morfología fúngica ligada a la pudrición del aguacate se aisló bajo experimentos en cámara de humedad y se denominó C08-9. El agente fúngico presentó micelio blanco con rápido crecimiento radial ( $6.5 \text{ mm día}^{-1}$ ) en agar dextrosa y papa y viró el medio de cultivo a color amarillo a los 7 días. Este presentó conidióforos penicilados adheridos a hifas hialinas organizadas en verticilos con tres o cuatro fiálides, mientras que los conidios primarios mostraron forma ovalada o sub-ovalada. Las dimensiones promedio de los conidios fue de  $10.57 \mu\text{m} \times$

in 2021. The fungus associated with the avocado fruit rot was isolated under humidity chamber conditions and it was named as C08-9. The fungal agent presented white cotton mycelium with fast radial growth ( $6.5 \text{ mm day}^{-1}$ ) in potato dextrose agar and it turned the culture medium to yellow color after seven days. The fungus contained penicillate conidiophores adhered to hyaline hyphae organized in whorls with three or four phialides whereas primary conidia showed oval to sub-oval shape. The average size of the conidia was  $10.57 \mu\text{m} \times 4.42 \mu\text{m}$  and the presence of chlamydo spores was also recorded. The molecular identification of the fungus was achieved by amplifying the partial nucleotide sequences of the 18S ribosomal gene (ITS; 543 bp) and the translation elongation factor 1 alpha gene (TEF-1 $\alpha$ ; 658 bp). The corresponding sequences were deposited at the NCBI-gene bank with the accessions OM473286 and OM715999, respectively.

**Key words:** *Persea americana* cv. Hass, soft rot, phytopathogenic fungus, northern highlands.

Mexico is the leading exporter of Hass avocado (*Persea americana*) in the world. The fruit is an important source of vitamins, fiber, phenols, and minerals that benefit human health (Rosero *et al.*, 2019). The most valuable nutrients of avocado are the unsaturated fatty acids accumulated in the pulp of the fruit (Rosero *et al.*, 2019). Like other fruits, avocados are a source of protein, fiber, and reducing sugars which are exploited by opportunistic phytopathogens. As a consequence of pathogen attack, fruit quality significantly decreases causing severe economic losses for producers.

Postharvest fungal diseases are one of the main threats to the avocado market. The *Colletotrichum*, *Lasioidiplodia*, *Sphaceloma*, *Pseudocercospora*,

$4.42 \mu\text{m}$  y también se registró la presencia de clamidosporas. La identificación molecular del hongo se logró mediante la amplificación de las secuencias parciales del gen ribosomal 18S (ITS; 543 pb) y del gen del factor de elongación 1 alfa (TEF-1 $\alpha$ ; 658 pb). Las secuencias correspondientes se depositaron en el banco de genes del NCBI con las accesiones OM473286 y OM715999, respectivamente.

**Palabras clave:** *Persea americana* cv. Hass, pudrición blanda, hongo fitopatógeno, sierra nororiental.

México es el principal exportador de aguacate Hass (*Persea americana*) en el mundo. El fruto es una fuente importante de vitaminas, fibra, fenoles y minerales que benefician la salud humana (Rosero *et al.*, 2019). Los nutrientes más valiosos del aguacate son los ácidos grasos insaturados acumulados en la pulpa del fruto (Rosero *et al.*, 2019). Al igual que otros frutos, los aguacates son una fuente de proteína, fibra y azúcares reductores que son aprovechados por fitopatógenos oportunistas. Como consecuencia del ataque de patógenos, la calidad de la fruta disminuye significativamente provocando graves pérdidas económicas para los productores.

Las enfermedades fúngicas poscosecha son una de las principales amenazas para el mercado del aguacate. Los géneros *Colletotrichum*, *Lasioidiplodia*, *Sphaceloma*, *Pseudocercospora*, *Rhizopus* y *Fusarium* se asocian comúnmente con el desarrollo de enfermedades poscosecha en aguacate (Perera *et al.*, 2020). Sin embargo, el espectro potencial de agentes fitopatógenos del aguacate puede variar según la región geográfica y las fluctuaciones climáticas. Puebla es el sexto productor de aguacate en México y la sierra norte de este estado se cataloga como una nueva zona para la producción de este valioso fruto. Al ser una zona nueva, la aparición

*Rhizopus*, and *Fusarium* genera are commonly associated with the development of postharvest diseases in avocado (Perera *et al.*, 2020). However, the potential spectrum of phytopathogenic agents of avocado may vary depending on the geographical region and climatic fluctuations. Puebla is the sixth producer of avocado in Mexico and the northern highlands of this state are tagged as a new area for the production of this valuable fruit. As a new area, the emergence of unknown species with infective potential is latent. In 2021, the avocado producers from the northern highlands of Puebla-Mexico reported an aggressive fruit blotch that caused severe damage and substantial economic losses in harvested avocados. In order to address the problem, this investigation was focused on the identification and isolation of the phytopathogen associated with this disease.

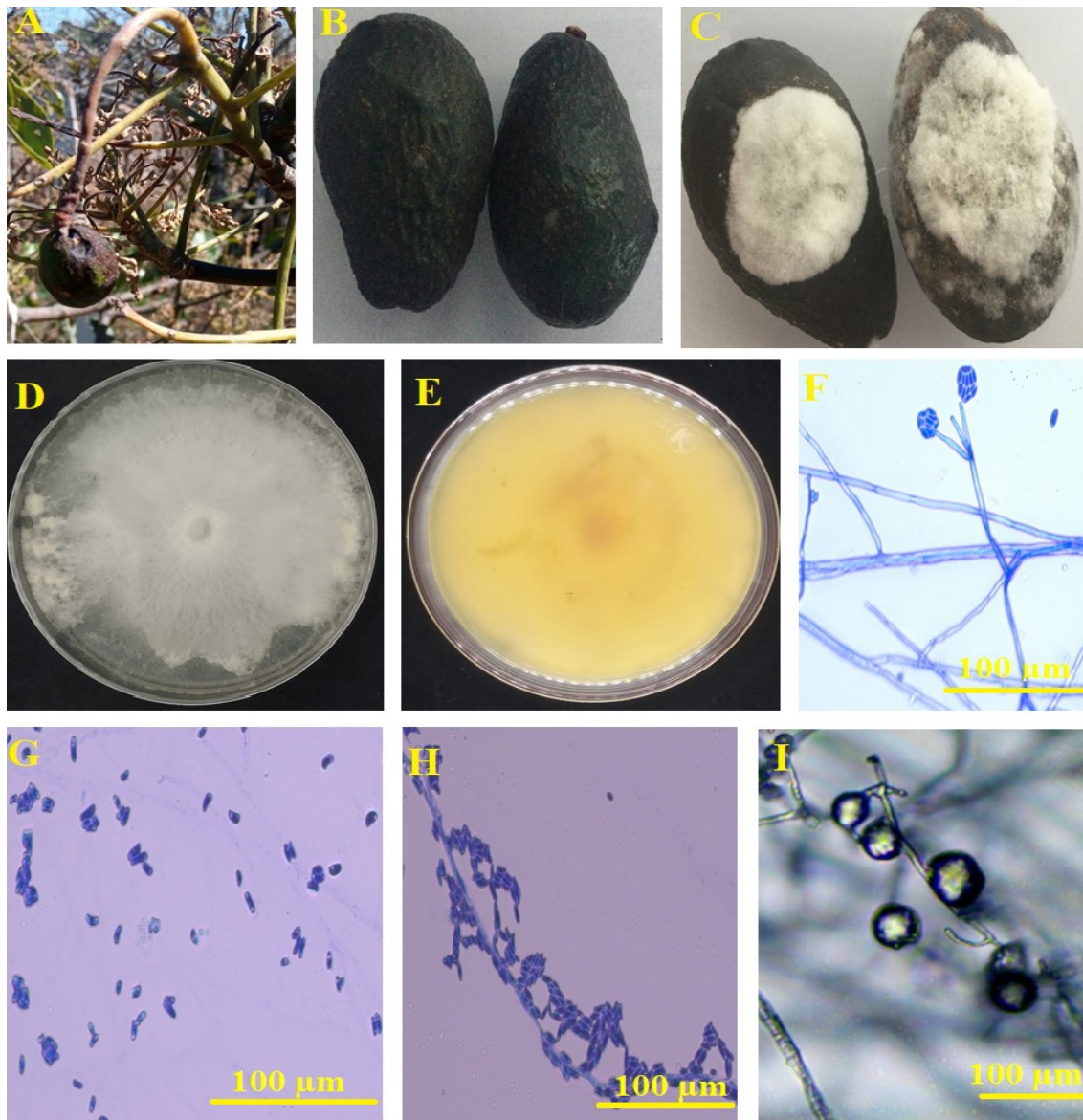
Under open field conditions, the symptoms of diseased fruits were loss of turgor, changes in fruit size, eventual mycelium emergence as well as pulp oxidation (Figure 1A). The incidence of fruit blotch was 56.9% in samples of different ripening stages. For further investigation, 50 diseased fruits (n=50) were harvested from 30 plants grown in 10 different plots during April 2021 in Yaonáhuac, Puebla, Mexico (19° 56' 55" N, 97° 26' 26" W; 1997 masl). These samples were transferred to the laboratory in plastic bags at 4 °C to be immediately sanitized by immersion in 20% sodium hypochlorite for 20 min and rinsed several times with sterile distilled water in a sterile cabinet (Pérez *et al.*, 2021). Posteriorly, these fruits were dried and placed in sterile humidity chambers (n=30) for 10 days at 28 °C and 70% relative humidity in order to identify the microorganisms associated with avocado rot (Pérez *et al.*, 2021).

Five different fungal morphologies were observed, isolated, and maintained in potato dextrose agar (PDA; Bioxon™) during these

de especies desconocidas con potencial infectivo es latente. En 2021, los productores de aguacate de la sierra norte de Puebla-México reportaron una pudrición agresiva en el fruto que causó daños severos en la producción de aguacate y pérdidas económicas sustanciales. Para abordar el problema, esta investigación se centró en la identificación y aislamiento del fitopatógeno asociado a esta enfermedad.

En condiciones de campo abierto, los síntomas de los frutos enfermos fueron pérdida de turgencia, cambios en el tamaño del fruto, eventual emergencia de micelio y oxidación de la pulpa (Figura 1A). La incidencia de frutos enfermos fue del 56.9% en muestras con diferente estado de maduración. Para investigación subsecuente, se cosecharon 50 frutos enfermos (n=50) de 30 plantas cultivadas en 10 parcelas diferentes durante abril de 2021 en Yaonáhuac, Puebla, México (19° 56' 55" N, 97° 26' 26" O; 1997 msnm). Estas muestras se trasladaron al laboratorio en bolsas plásticas a 4 °C para ser sanitizadas inmediatamente por inmersión en hipoclorito de sodio al 20% durante 20 min y se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril en campana de flujo laminar (Pérez *et al.*, 2021). Posteriormente, los frutos fueron secados y colocados en cámaras de humedad estériles (n=30) durante 10 días a 28 °C y 70% de humedad relativa con el fin de identificar los microorganismos asociados a la pudrición del aguacate (Pérez *et al.*, 2021).

Durante estos experimentos se observaron, aislaron y mantuvieron cinco morfologías fúngicas diferentes en agar papa dextrosa (PDA; Bioxon™). Las pruebas preliminares de patogenicidad se realizaron mediante la inserción de discos hifales (5 mm de diámetro) de cada hongo en aguacates sanos (recolectados en la zona de estudio) para su posterior incubación en una cámara de humedad durante 21 días. Como resultado, una morfología (designada como aislado C08-9) produjo signos de



**Figure 1.** Macroscopic and microscopic features of *C. rosea* strain C08-9 isolated in the northern highlands of Puebla, Mexico. A, Diseased fruits collected under open field conditions. B, Asymptomatic avocados treated with pure saline solution after 21 days post-inoculation. C, Diseased avocados treated with 1000 conidia dissolved saline solution after 21 days post-inoculation. D, Hyaline mycelium of *C. rosea* strain C08-9 from PDA cultures of 5 days old. E, Changes in the coloration of PDA medium caused by *C. rosea* strain C08-9. F, Penicillate conidiophores organized in whorls adhered to hyaline hyphae containing three or four phialides. G-H, Primary conidia showing oval or sub-oval shape. I, Chlamydospores linked to hyaline hyphae.

**Figura 1.** Características macroscópicas y microscópicas de la cepa C08-9 de *C. rosea* aislada en la sierra norte de Puebla, México. A, Frutos enfermos recolectados en condiciones de campo abierto. B, Aguacates asintomáticos tratados con solución salina pura 21 días después de la inoculación. C, Aguacates enfermos tratados con 1000 conidios disueltos en solución salina después de 21 días de la inoculación. D, Micelio hialino de *C. rosea* cepa C08-9 en cultivos de PDA de 5 días de edad. E, Cambios en la coloración del medio PDA provocados por la cepa C08-9 de *C. rosea*. F, Conidióforos penicilados organizados en verticilos adheridos a hifas hialinas que contienen tres o cuatro fiálicas. G-H, conidios primarias que muestran forma ovalada o sub-ovalada. I, Clamidosporas unidas a hifas hialinas.



experiments. Preliminary pathogenicity tests were done by inserting hyphal discs (5 mm diameter) of each fungus in healthy avocados (collected in the zone of study) for further incubation in a humidity chamber for 21 days. As a result, one morphology (designed as C08-9 isolate) produced signs of infection on the sixth-day post-inoculation whereas the other fungi did not produce any symptoms after 21 days. Formal pathogenicity tests were carried out in asymptomatic Hass avocados (n=20) using approximately 1000 conidia obtained from a monosporic culture of the isolate C08-9 (10 µL of a sterile saline solution containing  $1 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup>). The conidia were inoculated by mechanical penetration using a Hamilton syringe in the pericarp of sanitized asymptomatic avocados (n=20) under humidity chamber conditions. The control group (n=20) was only treated with an equivalent volume of saline solution. The microorganism associated with avocado fruit rot was re-isolated and subjected to molecular tests together with the original monosporic culture used. The molecular analyses were done with genomic DNA extracted as previously reported by Pérez *et al.* (2021). The molecular identity of the associated fungus was obtained by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) of the 18S ribosomal gene using the primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) and the PCR conditions previously reported by Duque-Bautista *et al.* (2017). The identity was confirmed by amplifying the translation elongation factor 1 alpha gene (TEF-1α) using the primers EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) and EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (Molnár *et al.*, 2015) using the same PCR conditions described by Duque-Bautista *et al.* (2017). The corresponding PCR products were purified with the GenElute™ PCR Clean-Up Kit from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis Mo. USA) and sequenced at Macrogen

infección en el sexto día posterior a la inoculación, mientras que los otros hongos no produjeron ningún síntoma después de 21 días. Se realizaron pruebas formales de patogenicidad en aguacates Hass asintomáticos (n=20) utilizando aproximadamente 1000 conidias obtenidas de un cultivo monospórico del aislado C08-9 (10 µL de una solución salina estéril con  $1 \times 10^5$  conidias mL<sup>-1</sup>). Las conidias fueron inoculadas por penetración mecánica en el pericarpio de aguacates asintomáticos desinfectados utilizando una jeringa Hamilton (n=20) en condiciones de cámara de humedad. El grupo de control (n=20) solo fue tratado con un volumen equivalente de solución salina. El microorganismo asociado a la pudrición del fruto del aguacate fue re-aislado y sometido a pruebas moleculares junto con el cultivo monospórico originalmente usado. Los análisis moleculares se realizaron con ADN genómico extraído como lo reporta previamente Pérez *et al.* (2021). La identidad molecular del hongo asociado se obtuvo secuenciando el espaciador transcrito interno (ITS) del gen ribosomal 18S utilizando los cebadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) y las condiciones de PCR reportadas previamente por Duque-Bautista *et al.* (2017). La identidad se confirmó amplificando el gen del factor de elongación de traducción 1 alfa (TEF-1α) utilizando los cebadores EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) y EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) (Molnár *et al.*, 2015) utilizando las mismas condiciones de PCR descritas por Duque-Bautista *et al.* (2017). Los productos de PCR correspondientes se purificaron con el GenElute™ PCR Clean-Up Kit de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis Mo. EE. UU.) y se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias correspondientes se almacenaron en la base de datos de nucleótidos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La caracterización morfológica se realizó con un

Inc. (Seoul, South Korea). The corresponding sequences were stored in the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The morphological characterization was done with a monosporic culture grown in PDA for 7 days which was exposed to the sunlight for 3 h followed by incubation at 4 °C for 4 h during a period of 10 days with the aim to be stressed. Microcultures prepared with the same medium were subjected to the same stressing process. After 10 days, the cultures and microcultures were subjected to microscopic analysis using a Primo Star Carl Zeiss Primo Star apparatus. The size of the conidia was calculated using the software Carl Zeiss™ AxioVision Rel. 4.8.2. The construction of the phylogenetic tree was done using sequences with high homology to that of *C. rosea* which were obtained from the NCBI nucleotide database. The sequences of both molecular markers (ITS and TEF-1 $\alpha$ ) were subjected to multiple alignments using the software Clustal X version 2.0. Posteriorly, the sequences were analyzed using the software MEGA 11.0.11 to be concatenated and to obtain a phylogenetic tree. The sequences subjected to phylogenetic analyses were those of the accessions MK752438.1, MK752494.1, MK752493.1, MK752436.1, MK752439.1, MK752495.1, MK752440.1, MK752496.1, MK752434.1, MK752492.1, MZ433204.1, MZ451398.1, MZ433200.1, MZ451395.1, MZ433199.1, MZ451394.1, MZ433198.1, MZ451393.1, MZ425507.1, MZ451389.1, MT215574.1, MT415234.1, MW199070.1, MW295970.1, OM473286.1 and OM715999.1. *Trichoderma stromaticum* strain GJS 97-181 was considered as an external parameter to contrast the results. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The bootstrap approaches were done with 1000 permutations. The tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary

cultivo monospórico crecido en PDA por 7 días el cual fue expuesto a la luz solar por 3 h seguido de incubación a 4 °C por 4 h durante un período de 10 días con el fin de estresarlo. Los microcultivos preparados con el mismo medio se sometieron al mismo proceso de estrés. Después de 10 días, los cultivos y microcultivos se sometieron a análisis microscópico usando un aparato Primo Star Carl Zeiss Primo Star. El tamaño de las conidias se calculó utilizando el software Carl Zeiss™ AxioVision Rel. 4.8.2. La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando secuencias con alta homología a la de *C. rosea* que se obtuvieron de la base de datos de nucleótidos del NCBI. Las secuencias de ambos marcadores moleculares (ITS y TEF-1 $\alpha$ ) fueron sometidas a alineamientos múltiples utilizando el software Clustal X versión 2.0. Posteriormente, las secuencias se analizaron mediante el software MEGA 11.0.11 para ser concatenadas y así obtener un árbol filogenético. Las secuencias sometidas a análisis filogenéticos fueron las de las accesiones MK752438.1, MK752494.1, MK752493.1, MK752436.1, MK752439.1, MK752495.1, MK752440.1, MK752496.1, MK752434.1, MK752492.1, MZ433204.1, MZ451398.1, MZ433200.1, MZ451395.1, MZ433199.1, MZ451394.1, MZ433198.1, MZ451393.1, MZ425507.1, MZ451389.1, MT215574, MW071, 9MT.413 .1, MW295970.1, OM473286.1 y OM715999.1. *Trichoderma stromaticum* cepa GJS 97-181 se consideró como parámetro externo para contrastar los resultados. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining. Las aproximaciones de “bootstrap” se realizaron con 1000 permutaciones. El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta. Se contempló un total de 2379 posiciones en el conjunto de datos final.

distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method. There were a total of 2379 positions in the final dataset.

According to the pathogenicity tests, healthy avocados inoculated with sterile saline solution did not present soft rot symptoms after 21 days post-inoculation (Figure 1B). However, avocados inoculated with conidia from the fungus associated with the fruit rot produced evident signs of infection after 6 days post-inoculation but, these were devastating after 21 days (Figure 1C).

The observed symptoms were loss of turgor, changes in epicarp pigmentation (melanin accumulation), and mycelial proliferation which were coincident with the features previously observed in the avocados collected in the zone of study (Figure 1A). The fungus presented white cotton mycelium with fast radial growth in PDA ( $6.5 \text{ mm day}^{-1}$ ) and it turned the culture medium to yellow color after 7 days (Figure 1D-1E). The microscopic features of the fungus revealed the presence of penicillate conidiophores organized in whorls containing three or four phialides (Sun *et al.*, 2020) (Figure 1F). The primary conidia showed oval or sub-oval shape (Figure 1G-1H). The average size of the conidia ( $n=200$ ) was  $10.57 \mu\text{m} \times 4.42 \mu\text{m}$ . The presence of chlamydo-spores was also observed (Figure 1I). These features coincided with the microscopic description reported by Sun *et al.* (2020) for *C. rosea*. The partial nucleotide sequences of the 18S ribosomal gene (ITS; 543 bp) and the translation elongation factor 1 alpha gene (TEF-1 $\alpha$ ; 658 pb) were deposited at the NCBI nucleotide databases with the accessions OM473286 and OM715999, respectively. The ITS sequences kept 99.6% homology with the accession MH864650 whereas the EF-1 $\alpha$  sequence had 99.8% homology with the accession KX184998 of *C. rosea* isolated from soil samples. These results

De acuerdo con las pruebas de patogenicidad, los aguacates sanos inoculados con solución salina estéril no presentaron síntomas de pudrición blanda después de 21 días post-inoculación (Figura 1B). Sin embargo, los aguacates inoculados con conidios provenientes del hongo asociado a la pudrición de la fruto produjeron signos evidentes de infección después de 6 días post-inoculación, pero estos fueron devastadores después de 21 días (Figura 1C).

Los síntomas observados fueron pérdida de turgencia, cambios en la pigmentación del epicarpio (acumulación de melanina) y proliferación micelial, los cuales coincidieron con las características previamente observadas en los aguacates recolectados en la zona de estudio (Figura 1A). El hongo presentó micelio algodonoso blanco con rápido crecimiento radial en PDA ( $6.5 \text{ mm día}^{-1}$ ) y viró el medio de cultivo a color amarillo a los 7 días (Figura 1D-1E). Las características microscópicas del hongo revelaron la presencia de conidióforos penicilados organizados en verticilos conteniendo tres o cuatro fiálides (Sun *et al.*, 2020) (Figura 1F). Las conidias primarias mostraron forma ovalada o sub-ovalada (Figura 1G-1H). El tamaño promedio de las conidias ( $n=200$ ) fue de  $10.57 \mu\text{m} \times 4.42 \mu\text{m}$ . También se observó la presencia de clamidosporas (Figura 1I). Estas características coincidieron con la descripción microscópica reportada por Sun *et al.* (2020) para *C. rosea*. Las secuencias parciales de nucleótidos del gen ribosomal 18S (ITS; 543 pb) y del gen del factor de elongación 1 alfa (TEF-1 $\alpha$ ; 658 pb) se depositaron en la base de datos de nucleótidos del NCBI con las accesiones OM473286 y OM715999, respectivamente. Las secuencias ITS mantuvieron 99.6% de homología con la accesión MH864650 mientras que la secuencia EF-1 $\alpha$  tuvo 99.8% de homología con la accesión KX184998 de *C. rosea* aislada de muestras de suelo. Estos resultados avalaron la identidad del hongo como *C.*

endorsed the identity of the fungus as *C. rosea*. To the best of our knowledge, there is not any report on the potential pathogenicity of *C. rosea* in avocados harvested around the world. However, previous investigations describe the devastating effect of a wild strain of *C. rosea* on *Vicia faba*, *Solanum tuberosum*, and *Glycine max* (Afshari and Hemmati, 2017). The phylogenetic analysis of the *C. rosea* strain isolated in this investigation (C08-9) revealed that the sum of the branch length was 0.22056366 and the corresponding scale for the concatenated sequences of the ITS-EF-1 $\alpha$  markers was 0.020 (Figure 2).

The strain C08-9 of *C. rosea* isolated in this investigation was grouped within samples reported

*rosea*. Hasta donde es sabido, no existe ningún informe sobre la patogenicidad potencial de *C. rosea* en los aguacates cosechados en todo el mundo. Sin embargo, investigaciones anteriores describen el efecto devastador de cepas silvestres de *C. rosea* en *Vicia faba*, *Solanum tuberosum* y *Glycine max* (Afshari y Hemmati, 2017). El análisis filogenético de la cepa de *C. rosea* aislada en esta investigación (C08-9) reveló que la suma de la longitud de la rama fue 0.22056366 y la escala correspondiente para las secuencias concatenadas de los marcadores ITS-EF-1 $\alpha$  fue 0.020 (Figura 2).

La cepa C08-9 de *C. rosea* aislada en esta investigación se agrupó dentro de muestras reportadas de diversos países. La mayor homología fue con

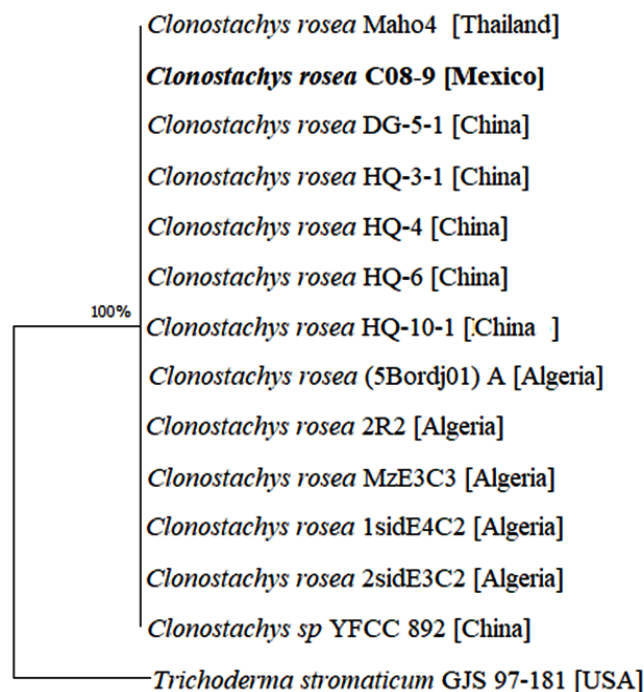


Figure 2. Phylogenetic analysis by the neighbor-joining method generated using MEGA 11.0.11 program with 1000 permutations for ITS/TEF-1 alpha sequences of *C. rosea*. *Trichoderma stromaticum* was used as an external reference and the strain C08-9 reported in this study is shown in bold font.

Figura 2. Análisis filogenético mediante el método neighbor-joining usando el programa MEGA 11.0.11 con 1000 permutaciones para las secuencias ITS/TEF-1 alfa de *C. rosea*. *Trichoderma stromaticum* se utilizó como referencia externa y la cepa C08-9 reportada en este estudio se muestran en negrita.



from diverse countries. The highest homology was with *C. rosea* isolated from the rotted root from *Astragalus membranaceus* grown in China, with the strain DG-5-1 isolated from the rotted root of *Angelica sinensis*, and with the strain Maho4 isolated from wild seeds and fruits collected in Thailand (Perera *et al.*, 2020). To construct a phylogenetic tree, *Trichoderma stromaticum* GJS 97-181 was considered as an external reference because of its genetic relationship with *C. rosea*. Our data indicate that *C. rosea* may have a monophyletic origin and probably the strain C08-9 is coming from a small housing population with pathogenic activity. As is known, the phenotypic variation produced by genetic changes associated with the adaptation process could probably be involved in the development of *C. rosea* pathogenicity. For further investigation, the strain C08-9 of *C. rosea* isolated in this investigation was cryopreserved in 15% glycerol at -80 °C in the ceparium of the Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento at the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. As a concluding remark, our investigation suggests the potential pathogenicity of *C. rosea* in avocado fruit and represents the first step to the generation of subsequent agroecological strategies to control this new threat to the avocado market.

#### ACKNOWLEDGMENTS

W.A.C.P. thank the fellowship 1024387 granted by CONACyT-Mexico to perform her MSc studies. She especially thank to the Coyotl-Pérez family and the Díaz-Pérez family for their unconditional support and dedicates this work to Rafaela Sandoval Pérez and Enrique Pérez Soriano. N.V.R. also thanks CONACyT-Mexico for the project 578 of the program “Investigadoras e Investigadores por México”.

*C. rosea* aislada de la raíz podrida de *Astragalus membranaceus* cultivada en China, con la cepa DG-5-1 aislada de la raíz podrida de *Angelica sinensis* y con la cepa Maho4 aislada de semillas y frutos silvestres recolectados en Tailandia (Perera *et al.*, 2020). Para construir un árbol filogenético, se consideró como referencia externa *Trichoderma stromaticum* GJS 97-181 por su relación genética con *C. rosea*. Los datos indican que *C. rosea* puede tener un origen monofilético y probablemente la cepa C08-9 proviene de una pequeña población habitacional con actividad patógena. Como es sabido, la variación fenotípica producida por cambios genéticos asociados al proceso de adaptación podría estar involucrada en el desarrollo de la patogenicidad de *C. rosea*. Para mayor investigación, la cepa C08-9 de *C. rosea* aislada en esta investigación fue criopreservada en glicerol al 15% a -80 °C en el cepario de la Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Como comentario final, los resultados sugieren la patogenicidad potencial de *C. rosea* en el fruto de aguacate y representa el primer paso para la generación de estrategias agroecológicas posteriores para controlar esta nueva amenaza para el mercado del aguacate.

#### AGRADECIMIENTOS

W.A.C.P. agradece la beca 1024387 otorgada por CONACyT-México para realizar sus estudios de maestría. La autora expresa un agradecimiento especialmente a la familia Coyotl-Pérez y a la familia Díaz-Pérez por su apoyo incondicional y dedica este trabajo a Rafaela Sandoval Pérez y Enrique Pérez Soriano. N.V.R. también agradece a CONACyT-México por el proyecto 578 del programa “Investigadoras e Investigadores por México”.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

## LITERATURE CITED

- Afshari N and Hemmati R. 2017. First report of the occurrence and pathogenicity of *Clonostachys rosea* on faba bean. *Australasian Plant Pathology* 46: 231-234. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0482-3>
- Duque-Bautista H, Zurita-Vásquez GG, Pacheco-Hernández Y, Villa-Ruano N. 2017. Etiology of a black spot symptom in *Agave angustifolia*: an *in vitro* approach towards its biological control. *Mexican Journal of Phytopathology* 35: 326-337. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1701-2>
- Molnár O, Bartók T and Szécsi A. 2015. Occurrence of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium musae* on banana fruits marketed in Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62: 109-119. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.2.2>
- Perera RH, Hyde KD, Maharachchikumbura SSN, Jones EBG, McKenzie EHC, Stadler M, Lee, HB, Samarakoon MC, Ekanayaka AH, Camporesi E, Liu JK and Liu ZY. 2020. Fungi on wild seeds and fruits. *Mycosphere* 11: 2108-2480. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/14>
- Pérez VMAK, Morales MLA, Romero AO, Rivera A, Landeta CG and Villa-Ruano N. 2021. First report of *Fusarium temperatum* causing fruit blotch of *Capsicum pubescens* in Puebla, México. *Plant Disease*. *In press* <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1941-PDN>
- Rosero JC, Cruz S, Osorio C and Hurtado N. 2019. Analysis of phenolic composition of byproducts (seeds and peels) of avocado (*Persea americana* Mill.) cultivated in Colombia. *Molecules* 24(17): 320917. <https://doi.org/10.3390/molecules24173209>
- Sun ZB, Li SD, Xu JL, Lu X and Sun MH. 2020. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. *Journal of Applied Microbiology* 129: 486-495. <https://doi.org/10.1111/jam.14625>