

Coinfection and *in vitro* interaction of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* associated with dieback in branches of mango (*Mangifera indica*) Manila variety, in Veracruz, Mexico

Coinfección e interacción *in vitro* de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* asociados a la muerte descendente en ramas de mango (*Mangifera indica*) variedad Manila, en Veracruz, México

Liliana Eunice Saucedo-Picazo, ¹Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. Universidad Veracruzana. Av. de las Culturas Veracruzanas 101, Col. Emiliano Zapata. Xalapa, Veracruz, México, CP 91090; **Luis Guillermo Hernández-Montiel**, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, Baja California Sur, México, CP 23096; **Norma Flores-Estévez**; **Patricia Gerez-Fernández**, Centro de Investigaciones Tropicales. Universidad Veracruzana. Calle José María Morelos 44, Col. Centro. Xalapa, Veracruz, México, CP 91000; **Angel Fernando Argüello-Ortiz**, Facultad de Economía. Universidad Veracruzana. Av. Xalapa s/n, Col. Obrero Campesina. Xalapa, Veracruz, México, CP 91020; **Juan Carlos Noa-Carrazana***.

*Corresponding author: jnoa@uv.mx

Received: March 17, 2022.

Accepted: June 02, 2022.

Sucedo-Picazo LE, Hernández-Montiel LG, Flores-Estévez N, Gerez-Fernández P, Argüello-Ortiz AF and Noa-Carrazana JC. 2022. Coinfection and *in vitro* interaction of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* associated with dieback in branches of mango (*Mangifera indica*) Manila variety, in Veracruz, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(3).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2203-4>

First DOI publication: June 23, 2022.

Primera publicación DOI: 23 de Junio, 2022.

Resumen. La enfermedad de la muerte descendente causada por complejos fúngicos es un problema severo en árboles de mango (*Mangifera indica*). Sus principales síntomas son pudrición de ramas, gomosis y finalmente la muerte del árbol. En este trabajo se identificaron las especies del complejo fúngico causante de la muerte descendente del mango en la variedad Manila en Veracruz, México. Se evaluó la interacción *in vitro* de dos especies pertenecientes al complejo, así como la severidad de la coinfección en ramas de mango. Se identificó a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y

Abstract. Dieback disease caused by fungal complexes is a severe problem in mango trees (*Mangifera indica*). Its main symptoms are branch rot, gummosis, and finally, the tree's death. In this work, the species of the fungal complex causing mango dieback in the Manila variety in Veracruz, Mexico were identified. The *in vitro* interaction of two species belonging to the complex was evaluated and the severity of the co-infection in mango branches. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* were identified as causal agents of mango dieback in the producing area of Veracruz. In coinfecting mango branches, greater severity of necrosis was observed than in individual infections. Liquid culture filtrates applied in co-cultures showed different results for each species of phytopathogen. The *P. mangiferae* filtrate had no significant antagonistic effects on the growth of *L. pseudotheobromae* (inhibition of 2.68%), while the *L. pseudotheobromae* filtrate inhibited 41.38% of *P. mangiferae*. The results show that multiple infections in mango trees increase the damage caused by dieback, which could directly impact the development of control strategies.

Keywords: gummosis, virulence, interaction, fungal complex.

The mango fruit is consumed all over the world for its exceptional flavor, but it also has antioxidant, immunomodulatory, antiallergic, anti-inflammatory, antitumor, antidiabetic, and antiparasitic properties, among others (Swaroop *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2021). This tropical fruit is of economic importance (Altendorf, 2019) and Mexico is the main exporter worldwide. Its main markets are the United States, Canada and Japan (SADER, 2020). Fungal diseases are the main phytosanitary problem for mango crops, affecting

Pestalotiopsis mangiferae como agentes causales de la muerte descendente de mango en la zona productora de Veracruz. En ramas de mango coinfectadas se observó mayor severidad de necrosis que en las infecciones individuales. Los filtrados de cultivos líquidos aplicados en co-cultivos mostró resultados diferentes para cada especie de fitopatógeno. El filtrado de *P. mangiferae* no tuvo efectos antagónicos significativos sobre el crecimiento de *L. pseudotheobromae* (inhibición del 2.7%), mientras que el filtrado de *L. pseudotheobromae* inhibió 41.4% el de *P. mangiferae*. Los resultados demuestran que la infección múltiple en árboles de mango incrementa el daño ocasionado por muerte descendente, lo cual podría impactar directamente en el desarrollo de las estrategias de control.

Palabras clave: gomosis, virulencia, interacción, complejo de hongos.

El mango es un fruto que se consume en todo el mundo por su excepcional sabor, además, tiene propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras, antialérgicas, antiinflamatorias, antitumorales, antidiabéticas, antiparasitarios, entre otras (Swaroop *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2021). Este frutal tropical es de importancia económica (Altendorf, 2019) y México es el principal país en exportación de mango a nivel mundial, siendo sus principales mercados: Estados Unidos, Canadá y Japón (SADER, 2020). Sin embargo, las enfermedades fúngicas son el principal problema fitosanitario en el cultivo afectando el rendimiento y calidad de la fruta (Elqassas y Abu-Naser, 2018). Una de las enfermedades importantes en los árboles de mango es la muerte descendente, la cual, es causada por diversas especies de hongos (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). La incidencia de esta enfermedad presenta incrementos; en algunos países como Omán, se ha

the yield and quality of the fruit (Elqassas and Abu-Naser, 2018). One of the most important diseases of mango trees is dieback, which is caused by various species of fungi (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). The incidence of this disease has been increasing; in some countries, such as Oman, the incidence is as high as 89% (Al-Adawi *et al.*, 2006), in Pakistan 83.3% (Khaskheli *et al.*, 2011), in Peru 29% (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). In Mexico, there have been no studies on the incidence of mango dieback, a lack that should be addressed. Sandoval-Sánchez *et al.* (2013) reported cases of dieback in mango trees in Mexico and their association with some phytopathogenic microorganisms. The present work assumed this premise and aimed to increase our knowledge of this disease in Manila mango trees in Mexico.

The characteristic symptoms of dieback in trees are gummosis, rotting of branches and trunk, decay, and chlorosis of the leaves (Marques *et al.*, 2013; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). The main fungal species associated with dieback belong to the family Botryosphaeriaceae and, recently, to the family Sporocadaceae (de-Oliveira *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021). The dominant genus of the family Botryosphaeriaceae is *Lasiodiplodia*, the most important species of which include *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. brasiliensis*, *L. iranensis*, *L. mahajangana*, and *L. hormozganensis* (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). In the family Sporocadaceae, the most significant genera are *Pestalotiopsis* and *Neopestalotiopsis* (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021). Chemical control of this disease has turned out to be a complex issue because the fungi are found in the xylem or parenchyma of branches and trunk (Al-Saadoon *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2019).

Coinfections are caused by multiple plant pathogens (Abdullah *et al.*, 2017) and dieback can be caused by various fungi (Chen *et al.*, 2012;

encontrado una incidencia de hasta el 89% (Al-Adawi *et al.*, 2006), en Pakistán del 83.3% (Khaskheli *et al.*, 2011) y en Perú de un 29% (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). Sin embargo, en México no se han hecho reportes de la incidencia de la muerte descendente del mango, por lo tanto, se requieren estudios para conocer el estatus de esta enfermedad. Sandoval-Sánchez *et al.* (2013) señalan incidencias de la muerte descendente en mango y su asociación con algunos microorganismos fitopatógenos. El presente trabajo retoma esta premisa y abona conocimientos de esta enfermedad en mango Manila.

Los síntomas característicos de la muerte descendente en los árboles son gomosis, pudrición de ramas y tronco, decaimiento y clorosis en las hojas (Marques *et al.*, 2013; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). Las principales especies de hongos asociadas a la muerte descendente pertenecen a la familia Botryosphaeriaceae y recientemente Sporocadaceae (de-Oliveira *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2021). El género dominante de la familia Botryosphaeriaceae es *Lasiodiplodia*, destacando a las especies: *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. brasiliensis*, *L. iranensis*, *L. mahajangana* y *L. hormozganensis* (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). En la familia Sporocadaceae, destacan los géneros *Pestalotiopsis* y *Neopestalotiopsis* (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021). El control químico de esta enfermedad ha sido complejo, debido a que los hongos se encuentran en el xilema o parénquima de ramas y el tronco (Al-Saadoon *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2019).

Las coinfecciones son enfermedades causadas por múltiples fitopatógenos (Abdullah *et al.*, 2017) y la muerte descendente puede ser originada por diversos hongos (Chen *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2013). El efecto de las coinfecciones en plantas ha sido poco investigado debido a la complejidad de estos patosistemas, las

Kwon *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2013). The effect of coinfections in plants has been little studied due to the complexity of these pathosystems. The assessments that have been conducted so far have focused on virus-virus, bacterium-fungus and fungus-fungus coinfections (Tollenaere *et al.*, 2016). Some studies have shown that fungal coinfections increase the prevalence and severity of diseases and spore production (Fang *et al.*, 2021; Susi *et al.*, 2015). However, plant pathogens may inhibit each other (Orton and Brown 2016; Lerch-Olson and Robertson, 2020). In mango trees, dieback has been caused by species of *Lasiodiplodia* and *Pestalotiopsis*; however, the effect of coinfection with both phytopathogens on the severity of this disease in branches is still unknown.

Various species of *Lasiodiplodia* and *Pestalotiopsis* are of interest for different industries due to the antimicrobial, anti-inflammatory, mycotoxic and cytotoxic properties, among others, of the compounds that can be extracted from them (Qian *et al.*, 2021; Salvatore *et al.*, 2020). However, the effect of these compounds on other phytopathogenic fungi is unknown. Therefore, the present study aimed to isolate and identify the phytopathogenic fungi associated with dieback of Manila mango trees to determine their *in vitro* interaction and their effect on the coinfection of *Mangifera indica* branches.

MATERIALS AND METHODS

Study site

A commercial orchard of mango var. Manila with a plantation age of 40 years, located at 19° 30.161" N and 096° 35.460" W in Actopan, Veracruz, Mexico. Using directed sampling, ten trees with dieback symptoms (gummosis, rotting of

evaluaciones realizadas se han centrado en la coinfección de virus-virus, bacterias-hongos y hongo-hongo (Tollenaere *et al.*, 2016). Algunos estudios han demostrado que las coinfecciones fúngicas aumentan la prevalencia y severidad de las enfermedades y la producción de esporas (Fang *et al.*, 2021; Susi *et al.*, 2015). Sin embargo, puede haber inhibición de un fitopatógeno hacia otro (Orton y Brown 2016; Lerch-Olson y Robertson, 2020). La muerte descendente en arboles de mango ha sido ocasionada por especies de *Lasiodiplodia* y *Pestalotiopsis*, sin embargo, se desconoce el efecto de la coinfección de ambos fitopatógenos sobre la severidad de la enfermedad en ramas.

Por otra parte, diversas especies de *Lasiodiplodia* y *Pestalotiopsis* han sido estudiadas por diferentes industrias debido a que sus compuestos presentan efecto antimicrobiano, antiinflamatorio, micotóxico, citotóxico, entre otros (Qian *et al.*, 2021; Salvatore *et al.*, 2020). Sin embargo, se desconoce el efecto que tienen estos compuestos sobre otros hongos fitopatógenos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue aislar e identificar a los hongos fitopatógenos asociados a la muerte descendente de árboles de mango Manila, determinar su interacción *in vitro* y su efecto en la coinfección de ramas de *Mangifera indica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

Se seleccionó una huerta comercial de mango var. Manila con una edad de la plantación de 40 años ubicada a una latitud 19° 30.161" N y longitud 096° 35.460" O en Actopan, Veracruz, México. Con un muestreo dirigido se seleccionaron 10 árboles con síntomas de muerte descendente (gomosis, pudrición de ramas y troncos). En ramas secundarias

branches and trunk) were selected. Three segments of 15 cm were cut and collected from 5 cm thick secondary branches from each tree for a total of thirty samples. The samples were stored in sterile plastic bags for later analysis.

Isolation of fungi and morphological characterization

The thirty collected samples were cut into 2 cm long chips, which were disinfected in a solution of sodium hypochlorite and water at 1% v/v for 2 min. They were then rinsed three times with sterile distilled water and dried on sterile paper. Two chips of each sample were seeded in plates with potato-dextrose agar (PDA) plus ampicillin (40 mg mL⁻¹), at 3 cm from the plate center and incubated at 28 °C for 9 days. The monospore fungal cultures obtained were reseeded on PDA until 40 pure cultures were obtained. The fungi were morphologically classified by the shape and color of the colony into 15 groups. To observe the microscopic structures and identify the genus of each fungus, the plates were cultured by alternating white and black light every 12 h for 15 days. The shape and color of the mycelium were observed in the plates at days 1, 3, 5, 7 and 9. The structures of the fungi were stained with cotton blue (Jackson and Johnson-Cicalese, 1988) and examined with a phase contrast microscope Axio Lab.A1 HAL 35, FL-LED, 5x H. The identification was done using the taxonomic keys of Clendenin (1896) and Maharachchikumbura *et al.* (2014) according to color of pycnidia (*Lasiodiplodia*), color and shape of conidiomata (*Pestalotiopsis*), shape and color of hyphae, and shape, color, and size of conidia.

Molecular identification

The molecular identification of the fungi that showed greater aggressiveness was conducted

con grosor de 5 cm, se colectaron tres segmentos de 15 cm de cada árbol, para tener un total de 30 muestras. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico estériles para su posterior análisis.

Aislamiento de hongos y caracterización morfológica

Las 30 muestras colectadas fueron cortadas en astillas de 2 cm de largo, las cuales se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio y agua al 1% v/v por 2 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron en papel estéril. En placas con agar-papa-dextrosa (PDA) más ampicilina (40 mg mL⁻¹) se sembraron dos astillas de cada muestra a una distancia de 3 cm de la parte central y se incubaron a 28 °C por 9 días. Los cultivos fúngicos monospóricos obtenidos fueron sembrados en PDA hasta obtener 40 cultivos puros. Los hongos fueron clasificados por morfología de la forma y color de la colonia y se obtuvieron 15 grupos para su identificación. Para observar las estructuras microscópicas e identificar los géneros de cada hongo, las placas se cultivaron intercalando luz blanca y negra por 12 h por 15 días. En las placas se observó la forma y color de micelio durante los días 1, 3, 5, 7 y 9. Las estructuras de los hongos fueron teñidas con azul de algodón (Jackson y Johnson-Cicalese, 1988) y examinadas con un microscopio de contraste de fases Estativo Axio Lab.A1 HAL 35, FL-LED, 5x H. Se utilizaron las claves taxonómicas de Clendenin (1896) y Maharachchikumbura *et al.* (2014), observando: color de picnidios (*Lasiodiplodia*), color y forma de conidiomas (*Pestalotiopsis*), forma y color de hifas, forma, color y tamaño de los conidios.

Identificación molecular

La identificación molecular de los hongos que presentaron mayor agresividad se realizó a partir de

by extracting genomic DNA according to the protocol of Lee (1990). The genomic DNA was used to amplify the following: 1) The internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA (ITS1–5.8S-ITS2 group) with the primers ITS1F (5' TCCGTAGGTCAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), according to the method and PCR conditions described by Manter and Vivanco (2007); 2) A partial β -tubulin gene (*benA*) with primers Bt-2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') and Bt-2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') according to the method and PCR conditions described by Úrbez-Torres *et al.* (2008). The PCR products obtained were sent to the Instituto Potosino A.C. (IPICYT) for sequencing. The sequences obtained were analyzed with the Chromas Pro1.7.6 software. Identity was verified with the NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) system. The amplified ITS and β -tubulin rDNA sequences were deposited in the Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pathogenicity test

The pathogenicity test was performed on branches of mango var. Manila obtained from a newly planted commercial orchard free of dieback disease located in the town of Los Idolos in Actopan, Veracruz, Mexico. The health of the branches was verified visually and through cultures in PDA medium (See the section on isolation and characterization of the isolates). In addition, control branches inoculated with PDA medium were used to rule out disease development. The branches were cut into 15 cm long segments and disinfected with 70% alcohol for 30 s; they were then rinsed three times with sterile water. The isolates were grouped into fifteen groups according to the morphological

la extracción del ADN genómico de acuerdo con el protocolo de Lee (1990). Con el ADN genómico se amplificó: 1) La región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr (grupo ITS1–5.8S-ITS2) con los cebadores ITS1F (5' TCCGTAGGTCAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') acorde a la metodología y condiciones de PCR descritas por Manter y Vivanco (2007) y 2) Un gen parcial de β -tubulina (*benA*) con los cebadores Bt-2a (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3') y Bt-2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') acorde con la metodología y condiciones de PCR descritas por Úrbez-Torres *et al.* (2008). Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar al Instituto Potosino A.C. (IPICYT). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software Chromas Pro1.7.6 y se comprobó la identidad con el sistema BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias amplificadas del ITS y β -tubulina del ADNr fueron depositadas en el Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó en ramas de mango var. Manila, obtenidas de una huerta comercial de reciente plantación libre de la enfermedad de muerte descendente ubicada en la localidad de Los Ídolos en Actopan, Veracruz, México. Se comprobó la sanidad de las ramas de manera visual y a través de siembras en medio PDA (Ver sección aislamiento y caracterización de los aislados). Adicionalmente se utilizaron ramas control inoculadas con medio PDA para descartar desarrollo de la enfermedad. Las ramas fueron cortadas en segmentos de 15 cm de largo y desinfectadas con alcohol al 70% por 30 s; posteriormente, fueron enjuagadas tres veces con agua estéril. De acuerdo con las

characteristics of the mycelium. Of the fifteen groups, only 5 of the genus *Lasiodiplodia* and 2 of the genus *Pestalotiopsis* showed pathogenicity. A wound was made in the middle of each mango branch using a dissection needle. An 8-mm-diameter mycelial plug of each fungus, previously cultivated on PDA plates for 7 days at 28 °C, was placed in each wound. A plug of PDA medium without phytopathogen was inoculated into each wound as control. The branches were incubated in glass plates for 7 days at 28 °C with a relative humidity of 70-80%. The presence of necrosis and gum was observed in the branches. The lesion area (mm²) was measured at days 1, 3, 5 and 7. The percentage of incidence (%I) was determined through the formula $\%I = x/N \times 100$, where x represents the number of diseased branches and N is the total number of branches evaluated. The experiment was conducted with a completely randomized experimental design with five replications. The fungi were re-isolated on PDA plates to confirm Koch's postulates.

Evaluation of *in vitro* growth by dual culture technique

The *in vitro* tests were performed on the strain S10 of *L. pseudotheobromae* and strain MN2 of *P. mangiferae*, which were the most virulent in the pathogenicity test. The *in vitro* evaluation was performed according to the modified protocol of Lawrence *et al.*, (2018). The fungi were seeded on PDA plates for seven days at 28 °C. Previous observations had found differences in the growth rate of both phytopathogens; therefore, two experiments were proposed. The first consisted of placing two 8-mm plugs of *P. mangiferae* MN2 on the lateral part of each plate with PDA and incubating them for two days at 28 °C. Subsequently, two 8-mm plugs of *L. pseudotheobromae* S10 were inoculated 2 cm from the *P. mangiferae* MN2 colony and incubated

características morfológicas del micelio los aislados se agruparon en 15 grupos. De los 15 grupos solo 5 del género *Lasiodiplodia* y 2 de *Pestalotiopsis* presentaron patogenicidad. En medio de cada rama de mango se realizó una herida con una aguja de disección y en cada herida se colocó un taquete micelial de 8 mm de diámetro de cada hongo previamente cultivado en placas con PDA por 7 días a 28 °C. Como control se inoculo en cada herida un taquete de medio PDA sin fitopatógeno. Las ramas se incubaron por 7 días en placas de vidrio a 28 °C con una humedad relativa de 70-80%. Se observó la presencia de necrosis y de goma en las ramas y se cuantificó el área de lesión (mm²) a los días: 1, 3, 5 y 7. Se determinó el porcentaje de incidencia (%I) a través de la fórmula: $\%I = x/N \times 100$, donde, x representa el número de ramas enfermas y N es el número total de ramas evaluadas. El experimento se realizó con un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. Los hongos fueron re-aislados en placas con PDA para confirmar los postulados de Koch.

Evaluación del crecimiento *in vitro* por técnica de cultivo dual

Las pruebas *in vitro* fueron realizadas con la cepa S10 de *L. pseudotheobromae* y MN2 de *P. mangiferae*, que fueron las de mayor virulencia en la prueba de patogenicidad. La evaluación *in vitro* se realizó de acuerdo con el protocolo modificado de Lawrence *et al.*, (2018). Los hongos fueron sembrados en placas con PDA por siete días a 28 °C. En observaciones previas se encontró diferencias en la velocidad de crecimiento de ambos fitopatógenos, por lo tanto, se plantearon dos experimentos. El primero, consistió en sembrar dos taquetes de 8 mm de *P. mangiferae* MN2 en la parte lateral de cada placa con PDA y se incubaron por dos días a 28 °C; posteriormente, se inocularon dos taquetes

for nine days at 28 °C. The second experiment consisted of performing a simultaneous inoculation of two 8-mm plugs (one of each phytopathogen) in the same plate with PDA. As a control, the fungi were also seeded individually in other PDA plates and a group of plates were inoculated with a plug of PDA medium without phytopathogen. The plates were incubated for 9 days at 28 °C. The coloration of the mycelium was observed in both fungi on days 1, 3, 5, 7 and 9. The presence of conidiomata was assessed in *P. mangiferae* MN2 on the same days. The stereoscopic microscope was used to check for any crossing of hyphae or the presence of an inhibition halo between them. Four replications of each treatment were performed with a completely randomized experimental design.

Assessment of fungal filtrates from *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae*

The effect of fungal filtrates on the growth of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 was evaluated following the procedure described by Naglot *et al.* (2015) and Hajieghrari *et al.* (2008). Fungi were cultivated separately in potato dextrose broth in a shaker at 150 rpm for 14 days at 28 °C. The culture medium was centrifuged at 6,000 rpm for 30 min and subsequently filtered through a 0.20 µm sterile membrane (Whatman). Plates were prepared with PDA medium plus the filtrates of each phytopathogen at a concentration of 50% v/v. The fungi had been previously sown on PDA plates for seven days at 28 °C. The plates containing the filtrate of *L. pseudotheobromae* S10 were inoculated in the center with an 8 mm plug with *P. mangiferae* MN2. The plates with the filtrate of *P. mangiferae* MN2 were inoculated in the center with an 8 mm plug with *L. pseudotheobromae* S10. As a control, the fungi were inoculated individually in PDA medium. As an absolute control, a PDA plug

de 8 mm de *L. pseudotheobromae* S10 a 2 cm de la colonia de *P. mangiferae* MN2 y se incubaron por nueve días a 28 °C. El segundo experimento consistió en realizar la inoculación de manera simultánea de dos taquetes de 8 mm de ambos fitopatógenos en la misma placa con PDA. Como control los hongos fueron sembrados individualmente y un grupo de placas fueron inoculadas con un taquete de medio PDA sin fitopatógeno. Las placas se incubaron por 9 días a 28 °C. En los días 1, 3, 5, 7 y 9 se observó la coloración del micelio en ambos hongos y en *P. mangiferae* MN2 la presencia de conidios. En el microscopio estereoscópico se observó si existía cruzamiento entre hifas o un halo de inhibición entre ellas. Se realizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento con un diseño experimental completamente al azar.

Evaluación de filtrados fúngicos de *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*

Para conocer el efecto de los filtrados fúngicos sobre el crecimiento de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 se realizó el protocolo de Naglot *et al.* (2015) y Hajieghrari *et al.* (2008). Los hongos por separado fueron cultivados en caldo papa dextrosa en un agitador a 150 rpm por 14 días a 28 °C. El medio de cultivo fue centrifugado a 6,000 rpm por 30 min y posteriormente fue filtrado a través de una membrana (Whatman) estéril de 0,20 µm. Se prepararon placas con medio PDA más los filtrados de cada fitopatógeno a una concentración del 50% vol/vol. Los hongos fueron previamente sembrados en placas con PDA por siete días a 28 °C. Las placas que contenían el filtrado de *L. pseudotheobromae* S10 fueron inoculadas con un taquete de 8 mm en la parte central con *P. mangiferae* MN2. Las placas con el filtrado de *P. mangiferae* MN2 fueron inoculadas con un taquete de 8 mm en la parte central con *L. pseudotheobromae* S10.

was inoculated in the PDA plates containing the filtrate of each fungus. The plates were incubated for 9 days at 28 °C. Four replicates per treatment were performed using a completely randomized experimental design. The coloration of the mycelium and, in the case of *P. mangiferae* MN2, the presence of conidiomata were recorded. The inhibition percentage (I) was measured according to the formula of Singh (2006): $I = (C-t)/C \times 100$, where *C* represents the diameter of the control colony and *t* the diameter of the colony with filtrate.

Fungal coinfection on mango branches

The effect of coinfection on mango branches was assessed using a modified protocol of Lawrence *et al.* (2018). *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 were previously seeded on PDA plates for 7 days at 28 °C. The branches were cut into 15 cm long segments, the surface was disinfected with 70% alcohol for 30 s and rinsed three times with sterile water. Two wounds, separated by 2 cm, were made in the central part of each branch with a sterile needle. An 8-mm-diameter mycelial plug of *P. mangiferae* MN2 was placed in the first wound, and an 8-mm-diameter mycelial plug of *L. pseudotheobromae* S10 was placed in the second one. For control purposes, branches were inoculated only with each fungus and another one was inoculated with plugs containing only PDA medium, without phytopathogen. The branches were incubated for seven days at 28 °C and a relative humidity of 70-80%. Five replicates were performed for each treatment in a completely randomized experimental design. The presence of necrosis and gum in the branches was recorded and the lesion area (mm²) was measured using the ImageJ program. The fungi were re-isolated on PDA plates to confirm Koch's postulates.

Como control se inocularon los hongos en forma individual en medio PDA y como control absoluto se inoculo un taquete de PDA en las placas con PDA que contenían el filtrado de cada hongo. Las placas se incubaron por 9 días a 28 °C. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento y se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se observó la coloración del micelio y en el caso de *P. mangiferae* MN2 la presencia de conidiomas. El porcentaje de inhibición (I) se midió de acuerdo a la fórmula de Singh (2006): $I = (C-t)/C \times 100$, donde *C* representa el diámetro de la colonia control y *t* el diámetro de la colonia con filtrado.

Coinfección de los hongos en ramas de mango

El efecto de las coinfecciones en ramas se realizó con el protocolo de Lawrence *et al.* (2018) con modificaciones. *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 fueron previamente sembrados en placas con PDA por 7 días a 28 °C. Las ramas fueron cortadas en segmentos de 15 cm de largo, la superficie fue desinfectada con alcohol al 70% por 30 s y enjuagadas tres veces con agua estéril. En la parte central de cada rama con una aguja estéril se realizaron dos heridas separadas por 2 cm. En la primera herida se colocó un taquete micelial de 8 mm de diámetro de *P. mangiferae* MN2, y en la segunda un taquete micelial de 8 mm de diámetro de *L. pseudotheobromae* S10. Para efectos de controles se incluyeron tratamientos de ramas inoculadas solo con cada hongo y otro inoculado solo con taquetes de medio PDA sin fitopatógeno. Las ramas se incubaron por siete días a 28 °C y una humedad relativa de 70-80%. Se realizaron cinco repeticiones por cada tratamiento con un diseño experimental completamente al azar. Se observó la presencia de necrosis y de goma en la rama y se cuantificó el área de lesión (mm²) a través del programa ImageJ. Los hongos fueron re-aislados en placas con PDA para confirmar los postulados de Koch.

Statistical analysis

The statistical analysis of the obtained data was based on analysis of variance (ANOVA) using the SPSS statistical software. The analyzed data corresponded to lesion area and inhibition percentage. Significant differences ($p \leq 0.05$) between means were determined using Tukey's post hoc test.

RESULTS

Isolation and morphological identification of fungi

Forty isolates were obtained, and 15 groups of fungi were formed from the sampled trees with dieback symptoms (Figure 1A-C). A representative of each group was characterized, resulting in 13 fungi of the genus *Lasiodiplodia* and two of the genus *Pestalotiopsis*. Seven isolates were selected for morphological identification according to their level of aggressiveness: five of them belonged to the species *L. pseudotheobromae* and two to the species *P. mangiferae*. The following morphological characteristics were observed for each fungus:

In the first three days, the five isolates of *L. pseudotheobromae* showed a white cottony mycelium (Figure 2D). In the fourth day, the mycelium showed a grayish color, and from day seven the color changed to grayish-black (Figure 2E). When the plates were exposed to black and white light, dark brown pycnidia were formed. The hyphae were filamentous, septate, with constricted septum, and dark brown in color. The conidia were ellipsoidal, with a rounded apex and base, two dark brown septa and an average size ($N=100$) of $23.4 \mu\text{m}$ in length \times $14.25 \mu\text{m}$ in width (Figure 2F). The five isolates were identified as *L. pseudotheobromae* according to Clendenin's taxonomic keys (1896).

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se estimaron a través de las medias y desviaciones estándar mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando software estadístico SPSS. Los datos analizados fueron área de lesión y porcentaje de inhibición. Las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las medias se determinaron mediante la prueba post hoc Tukey's.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación morfológica de hongos

Se obtuvieron 40 aislamientos y se formaron 15 grupos de hongos de los árboles muestreados con síntomas de muerte descendente (Figura 1A-C). Se caracterizó un representante de cada grupo dando como resultado 13 de género *Lasiodiplodia* y dos de *Pestalotiopsis*. De acuerdo con el nivel de agresividad, fueron seleccionados siete aislamientos para la identificación morfológica: cinco pertenecientes a la especie *L. pseudotheobromae* y dos a la especie *P. mangiferae*. Las características morfológicas observadas de cada hongo fueron las siguientes:

Los cinco aislamientos de *L. pseudotheobromae* en los primeros tres días presentaron micelio algodonoso de color blanco (Figura 2D), en el cuarto día el micelio se pigmentó color grisáceo y a partir del día siete la coloración cambió a grisáceo negro (Figura 2E). Al exponer las placas en luz blanca y negra se formaron picnidios color marrón oscuro. Las hifas fueron filamentosas, septadas, constrictivas en el tabique y color marrón oscuro. Los conidios fueron elipsoidales, ápice y base redondeada, con dos septos color marrón oscuro, con un tamaño promedio ($N=100$) de $23.4 \mu\text{m}$ de largo \times $14.25 \mu\text{m}$ de ancho (Figura 2F). De acuerdo con las

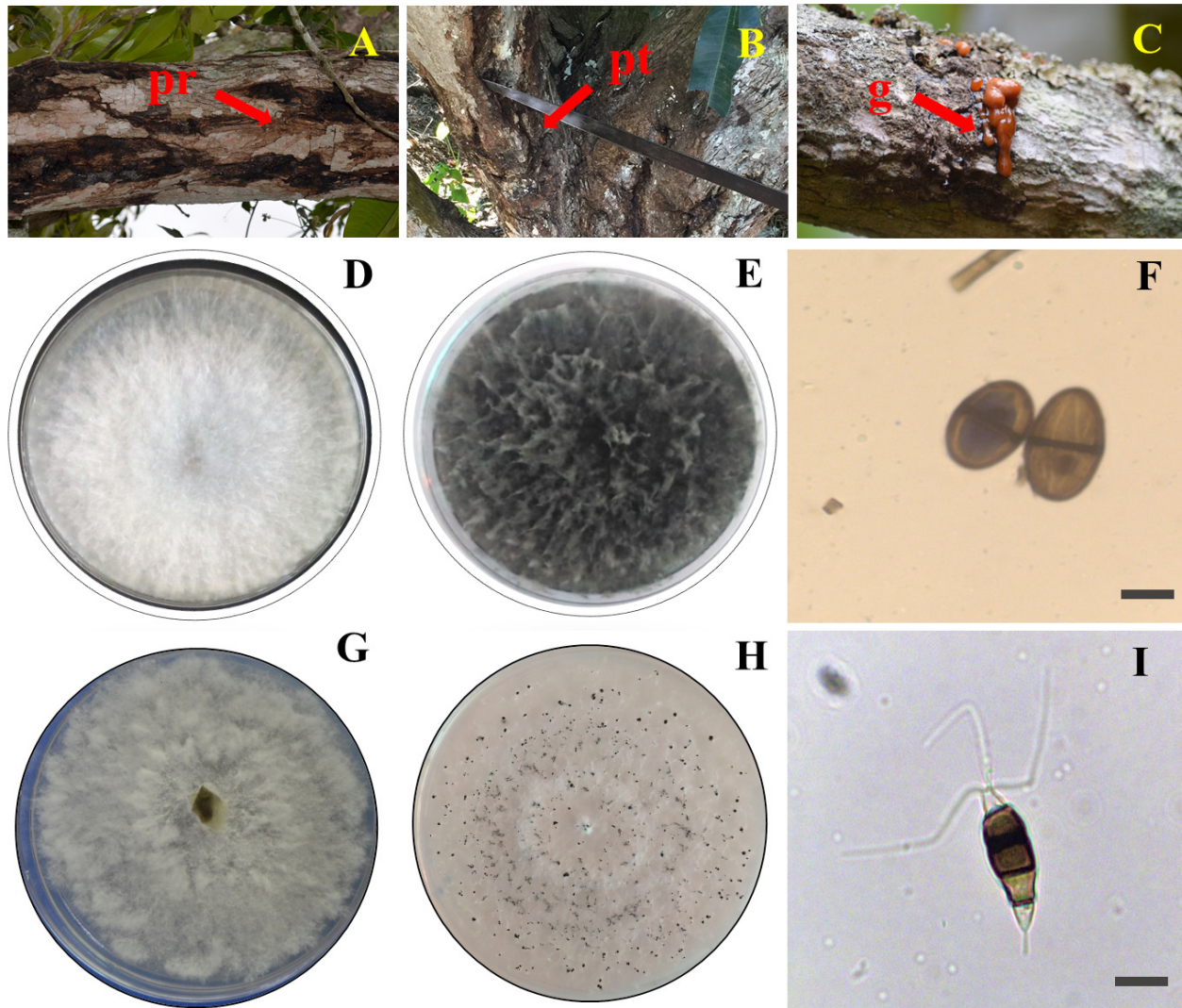


Figure 1. Symptoms of dieback in mango trees var. Manila and morphological characterization of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae*. A) Rotting on branches (pr), B) Rotting on trunk (pt), C) Gummosis (g), D) Mycelial growth of *L. pseudotheobromae* cottony white, E) Micellar growth of *L. pseudotheobromae* greyish-black, F) Conidia of *L. pseudotheobromae* dark brown (100x), G) Cottony white mycelial growth of *P. mangiferae*, H) Presence of *P. mangiferae* conidiomata e I) Conidia of *P. mangiferae* dark brown-black (100x).

Figura 1. Síntomas de la muerte descendente en árboles de mango var. Manila y caracterización morfológica de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae*. A) Pudrición en ramas (pr), B) Pudrición de tronco (pt), C) Gomosis (g), D) Crecimiento micelial de *L. pseudotheobromae* blanco algodonosos, E) Crecimiento micelar de *L. pseudotheobromae* grisáceo negro, F) Conidios marrón obscuro de *L. pseudotheobromae* (100x), G) Crecimiento micelial blanco algodonoso de *P. mangiferae*, H) Presencia de conidiomas de *P. mangiferae* e I) Conidios color marrón obscuro negro *P. mangiferae* (100x).

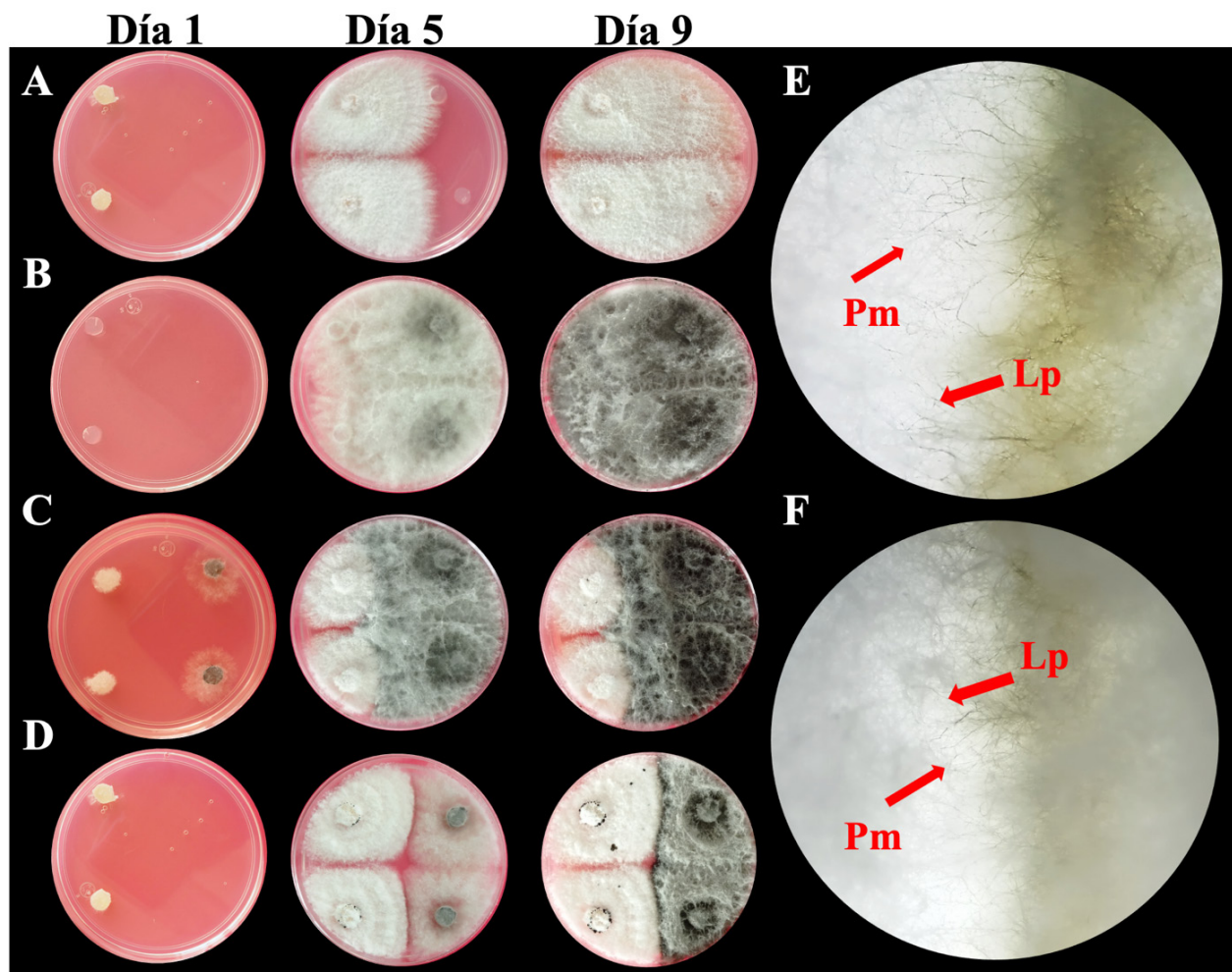


Figure 2. Mycelial growth of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* and hyphal interaction during the dual inoculation technique. A) *Pestalotiopsis mangiferae* MN2, B) *Lasiodiplodia pseudotheobromae* S10, C) *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10, D) Crossing of hyphae of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 inoculated two days later, E) Crossing of hyphae of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 and F) Interaction between *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 inoculated two days later.

Figura 2. Crecimiento micelial durante la técnica de inoculación dual de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* e interacción de hifas. A) *Pestalotiopsis mangiferae* MN2, B) *Lasiodiplodia pseudotheobromae* S10, C) *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10, D) Cruzamiento de hifas de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 inoculada dos días después, E) Cruzamiento de hifas de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 e F) Interacción *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 inoculada dos días después.

When subjected to alternating white and black light, the mycelial growth of *P. mangiferae* from days one to seven was irregular, cottony and diffuse, with a white coloration (Figure 2G). A cream coloration developed in the mycelium before the appearance of conidiomata. On day nine, black

claves taxonómicas de Clendenin (1896) los cinco aislamientos fueron identificados como *L. pseudotheobromae*.

Por otra parte, al intercalar luz blanca y negra el crecimiento micelial de *P. mangiferae* desde el día uno al siete fue irregular algodonoso y difuso con

pycnidial and globose conidiomata (Figure 2H) and hyaline and septate hyphae were observed. The indistinct brown conidia were slightly curved ellipsoid in shape with 4 septa and between 2 and 3 flagella. The average conidia size was $26.5 \mu\text{m}$ long \times $7.2 \mu\text{m}$ wide (Figure 2I). The two isolates were identified as *P. mangiferae* according to the taxonomic keys of Maharachchikumbura *et al.* (2014).

The sequences of the ITS and β -tubulin regions of three *Lasiodiplodia* isolates, as well as an ITS sequence from *Pestalotiopsis*, were deposited in GenBank. *L. pseudotheobromae* S10 (MH181156, OL988629), *L. pseudotheobromae* SN (MH179101, OL988630), *Lasiodiplodia* II3 (OK648476, OL988631), and *Pestalotiopsis mangiferae* MN2 (MH179308). The resulting amplifications were 550 bp for the ITS and 430 bp for β -tubulin. Analysis of the sequences in the GenBank database identified the species *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* in the ITS regions by 100% and in the β -tubulin regions by 99%. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* were identified based on their morphological and molecular characteristics.

Pathogenicity tests

Necrosis and gummosis were observed after seven days in the mango branches inoculated with *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae*. Significant differences ($P < 0.05$) were observed in the lesion area between the branches inoculated with each phytopathogen (Table 1). On day seven, isolate S10 of *L. pseudotheobromae* showed the highest aggressiveness compared to the rest of the isolates, generating a lesion area of 28.22 mm^2 . The MN2 isolate of *P. mangiferae* showed a larger lesion area of 8.44 mm^2 compared to the SN1 isolate. Isolates

una coloración blanca (Figura 2G). Antes de mostrar los conidiomas se desarrolló en el micelio una coloración crema. En el día nueve se presentaron conidiomas negros picnidiales y globosas (Figura 2H) e hifas hialinas y septadas. Los conidios color marrón indistintos de forma elipsoide ligeramente curvada con 4 septos y entre 2-3 flagelos. El promedio del tamaño de conidios fue de $26.5 \mu\text{m}$ de largo \times $7.2 \mu\text{m}$ de ancho (Figura 2I). De acuerdo con las claves taxonómicas de Maharachchikumbura *et al.* (2014) los dos aislamientos se identificaron como *P. mangiferae*.

Las secuencias de las regiones ITS y β -tubulina de tres aislamientos de *Lasiodiplodia*, así como una secuencia ITS de *Pestalotiopsis* fueron depositadas en el GenBank. *L. pseudotheobromae* S10 (MH181156, OL988629), *L. pseudotheobromae* SN (MH179101, OL988630) y *Lasiodiplodia* II3 (OK648476, OL988631) y *Pestalotiopsis mangiferae* MN2 (MH179308). Las amplificaciones resultantes fueron de 550 pb para el ITS y 430 pb para la β -tubulina y el análisis de las secuencias en la base de datos del GenBank identificaron a las especies *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* en las regiones ITS en un 100% y β -tubulina en un 99%. De acuerdo con las características morfológicas y moleculares se identificó a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae*.

Pruebas de patogenicidad

Se observó después de siete días necrosis y gomosis en las ramas de mango inoculadas con *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el área de lesión de las ramas inoculadas con cada fitopatógeno (Cuadro 1). El aislamiento S10 de *L. pseudotheobromae* en el día siete presentó la mayor agresividad en comparación con el resto de los aislamientos,

Table 1. Lesion area in branches of mango var. Manila inoculated with isolates of *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae*. Cuadro 1. Área de lesión de ramas de mango var. Manila inoculadas con aislamientos de *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*.

Aislamiento	Incidencia (%)	Día 1	Día 3	Día 5	Día 7
		Área de lesión (mm ²) ^y			
<i>L. pseudotheobromae</i> SN	100	3.77±0.5 d ^z	7±0.88cd ^z	12.77±0.83c ^z	21.55±0.5d ^z
<i>L. pseudotheobromae</i> LB2	100	2.44±0.38c	6.33±0.88c	10.11±0.50b	17.33±0.57c
<i>L. pseudotheobromae</i> S10	100	5.66±0.66 e	8.27±0.58d	15.44±0.83d	28.22±1.7e
<i>L. pseudotheobromae</i> AA	100	0.88±0.38a	1.56±0.32a	2.27±0.9a	3.33±0.4a
<i>L. pseudotheobromae</i> II3	100	2.44±0.38c	3.46±0.17b	8.22±0.5b	19.22±0.5cd
<i>P. mangiferae</i> MN2	100	2.33±0.33 c	2.78±0.1ab	4.22±1.5a	8.44±1b
<i>P. mangiferae</i> SN1	100	1.5 ±0.29 b	2.1±0.2 ab	2.56±0.6a	3.86±0.4a

^y Each value represents the mean ± standard deviation. ^z Means with different letters in each column are statistically different (Tukey, p≤0.05). / ^y Cada valor representa la media ± desviación estándar. ^z Medias con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).

SN, LB2, S10 and II3 of the genus *Lasiodiplodia* caused a larger lesion area compared to the two isolates of *Pestalotiopsis*. The incidence rate of the disease was 100% in all the branches inoculated with both phytopathogens. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *P. mangiferae* were re-isolated from the branches, confirming Koch's postulates.

Evaluation of *in vitro* growth by dual culture technique

The results of the dual inoculation treatment did not show differences in the coloration of the mycelium between *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10. The presence of conidiomata in *P. mangiferae* MN2, which was inoculated two days before *L. pseudotheobromae*, was observed on the seventh day. Individual inoculations did not present conidiomata. In the plates inoculated two days later, the growth of both fungi seemed to auto-equalize. A crossing between the hyphae of both species was observed in the microphotographs (Figure 2E-F). No inhibition halos were observed in the contact zone between

generando un área de lesión de 28.22 mm². El aislamiento MN2 de *P. mangiferae* presentó un área mayor de lesión de 8.44 mm² en comparación al aislado SN1. Los aislados SN, LB2, S10 y II3 del género *Lasiodiplodia* causaron mayor área de lesión en comparación con los dos de *Pestalotiopsis*. El porcentaje de incidencia de la enfermedad fue del 100% en todas las ramas inoculadas con ambos fitopatógenos. De las ramas fueron re-aislados a *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*, confirmando los postulados de Koch.

Evaluación del crecimiento *in vitro* por técnica de cultivo dual

Los resultados del tratamiento de inoculación dual no presentaron diferencias en la coloración del micelio de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10. Se observó en el séptimo día la presencia de conidios en *P. mangiferae* MN2 cuando se inoculó dos días antes que *L. pseudotheobromae*, las inoculaciones individuales no presentaron las estructuras. En las placas inoculadas dos días después se observó un auto emparejamiento en el crecimiento de ambos hongos. En las microfotografías

P. mangiferae MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 (Figure 2A-D).

***In vitro* evaluation of fungal filtrates**

The percentage of inhibition of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10 showed significant differences ($P < 0.05$) between the treatments. No changes were observed in the coloration of the mycelium during the growth of both fungi. *P. mangiferae* MN2 did not show conidiomata. The filtrate of *L. pseudotheobromae* S10 inhibited the growth of *P. mangiferae* MN2 by 41.38%. The percentage of inhibition of the filtrate of *P. mangiferae* MN2 on the growth of *L. pseudotheobromae* S10 was 2.68%.

Coinfection of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* in mango branches

Gummosis and necrosis were observed in mango branches inoculated with *L. pseudotheobromae* S10 and *P. mangiferae* MN2 (Figure 3). There were significant differences in lesion area between the coinfection and individual infection treatments. In coinfection treatments, the lesion area was larger

se observó un cruzamiento entre las hifas de ambas especies (Figura 2E-F). No se observaron halos de inhibición en la zona de contacto entre *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 (Figura 2A-D).

Evaluación *in vitro* de filtrados fúngicos

El porcentaje de inhibición de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10 presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Durante el crecimiento de ambos hongos no se observaron cambios en la coloración del micelio. *P. mangiferae* MN2 no presentó conidiomas. El filtrado de *L. pseudotheobromae* S10 inhibió el crecimiento de *P. mangiferae* MN2 en 41.38%. El porcentaje de inhibición del filtrado de *P. mangiferae* MN2 sobre el crecimiento de *L. pseudotheobromae* S10 fue de 2.68%.

Coinfección de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae* en ramas de mango

Se observó gomosis y necrosis en las ramas de mango inoculadas con *L. pseudotheobromae* S10 y *P. mangiferae* MN2 (Figura 3). Entre los



Figure 3. Coinfection in Manila mango branches on days 1, 3 and 5. A. Individual inoculation of *L. pseudotheobromae* S10. B. Individual inoculation of *P. mangiferae* MN2. C. Dual inoculation of *P. mangiferae* MN2 and *L. pseudotheobromae* S10.

Figura 3. Coinfección en ramas de mango variedad Manila a los días 1, 3 y 5. A. Inoculación individual de *L. pseudotheobromae* S10. B. Inoculación individual de *P. mangiferae* MN2. C. Inoculación dual de *P. mangiferae* MN2 y *L. pseudotheobromae* S10.

compared to individual inoculations (Table 2). The lesion area was clearly seen to increase significantly in coinfection treatments. The control branches did not show a lesion area. The presence of gummosis, a characteristic symptom of dieback, was not observed. Necrotic tissue was obtained from each branch and the species *L. pseudotheobromae* S10 and *P. mangiferae* MN2 were re-isolated, confirming Koch's postulates.

DISCUSSION

The fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae* has been reported as the causative agent of mango dieback individually and as fungal complexes in various parts of the world such as Brazil, Egypt, Peru, Korea, and Australia, among others (Sakalidis *et al.*, 2011; Ismail *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2017; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). In Mexico, the presence of *L. pseudotheobromae* has been associated with the death of mango trees of the Tommy Atkins and Ataulfo varieties in the states of Colima, Guerrero, Jalisco and Michoacán (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). The present study reports for the first time the presence of *L.*

tratamientos de coinfección e infección individual se presentaron diferencias significativas en área de lesión. En la coinfección el área de lesión fue mayor en comparación cuando fueron inoculaciones individuales (Cuadro 2). En la coinfección se ve de manera clara el aumento en el área de lesión aumenta significativamente. Las ramas control no presentaron área de lesión, no se observó la presencia de gomosis síntoma característico de la muerte descendente. A partir de cada rama se obtuvo tejido necrosado y fueron re-aisladas las especies de *L. pseudotheobromae* S10 y *P. mangiferae* MN2, confirmando los postulados de Koch.

DISCUSIÓN

El hongo *Lasiodiplodia pseudotheobromae* ha sido reportado como el agente causal de la muerte descendente en mango de manera individual y en forma de complejos en diversas partes del mundo como: Brasil, Egipto, Perú, Corea, Australia, entre otros (Sakalidis *et al.*, 2011; Ismail *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2017; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). En México, la presencia de *L. pseudotheobromae*, se ha asociado a la muerte de árboles de mango en

Table 2. Coinfection of *Pestalotiopsis mangiferae* MN2 and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* S10 in mango branches after 5 days.
Cuadro 2. Coinfección de *Pestalotiopsis mangiferae* MN2 y *Lasiodiplodia pseudotheobromae* S10 en ramas después de 5 días.

Tratamiento	Área de lesión (mm ²) ^y
Control (PDA)	0.0±0.1 ^a
<i>L. pseudotheobromae</i> S10 individual	24.7±3.7 ^b
<i>P. mangiferae</i> MN2 individual	2.7±1.2 ^a
<i>L. pseudotheobromae</i> S10 + <i>P. mangiferae</i> MN2 coinfección	39.3±2.5 ^c

^y Each value represents the mean ± standard deviation. / ^y Cada valor representa la media ± desviación estándar.

^z Means with different letters are statistically different (Tukey, p≤0.05). / ^z Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).

pseudotheobromae in mango trees var. Manila with dieback symptoms in Veracruz. In recent years, the importance of the genus *Pestalotiopsis* has increased due to the damage it causes to plants of commercial importance such as peach and blueberry plants (Chen *et al.*, 2012; Borrero *et al.*, 2018; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020). In mango, *P. mangiferae* has been associated with leaf spot (Rakesh *et al.*, 2020). However, so far it has not been reported as part of the complex that causes dieback, unlike other species of the genus such as *P. theae* (de-Oliveira *et al.*, 2010; Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). The present study provides the first report of *P. mangiferae* as part of the complex causing dieback in mango var. Manila.

In different ecosystems, plants interact with multiple groups of microorganisms, including phytopathogenic fungi, which interact with each other forming different ecological relationships (Liu *et al.*, 2019). Although there are various reports on phytopathogenic fungi that associate to form complexes and cause diseases in various crops, little is known about their interaction and the mutual effect they have on their growth (Abdullah *et al.*, 2017; 2018). The results of the present study using dual culture suggest a neutral interaction between *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae* when hyphal crossing is observed instead of an area of antagonism. The results coincide with those that were previously reported on the interaction between *Seimatosporium vitifusiforme* and *Diplodia seriata* in grapevines. (Lawrence *et al.*, 2018). The interaction between fungi in a particular space and time could give rise to the formation of complexes that cause diseases in various plants, including dieback in mango (Junaid *et al.*, 2020).

Various phytopathogenic fungi produce antifungal compounds, such as phenols, terpenes, and flavonoids, which can inhibit the growth of various microorganisms, including fungi. This has been used as a biotechnological control strategy

las variedades Tommy Atkins y Ataulfo en Colima, Guerrero, Jalisco y Michoacán (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). Este estudio reporta por primera vez a *L. pseudotheobromae* en árboles de mango var. Manila con síntomas de muerte descendente en Veracruz. Por otra parte, en los últimos años la importancia del género *Pestalotiopsis* se ha incrementado debido a los daños que ocasiona en plantas como melocotón y arándanos (Chen *et al.*, 2012; Borrero *et al.*, 2018; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2020). En mango, *P. mangiferae* se ha asociado con la mancha foliar (Rakesh *et al.*, 2020), sin embargo, hasta el momento no ha sido reportado como parte del complejo causante de la muerte descendente, a diferencia de otras especies del género como *P. theae* (de-Oliveira *et al.*, 2010; Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013). Nuestro estudio aporta el primer reporte de *P. mangiferae* como parte del complejo causante de la muerte descendente en el cultivo de mango var. Manila.

En los diferentes ecosistemas las plantas interactúan con múltiples grupos de microorganismos incluyendo a los hongos fitopatógenos, los cuales, interactúan entre sí formando diferentes relaciones ecológicas (Liu *et al.*, 2019). Aunque existen diversos reportes sobre hongos fitopatógenos que se asocian para formar complejos y causar enfermedades en diversos cultivos, poco se conoce acerca de su interacción y el efecto entre ellos sobre su crecimiento (Abdullah *et al.*, 2017; 2018). Los resultados de este estudio del cultivo dual sugieren una interacción neutral *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*, al observarse cruzamiento de hifas y no un área de antagonismo, coincidiendo los resultados con lo reportado durante la interacción entre *Seimatosporium vitifusiforme* y *Diplodia seriata* en la vid (Lawrence *et al.*, 2018). La interacción entre hongos en un espacio y tiempo definido podría dar origen a la formación de complejos que causan enfermedades en diversas plantas incluyendo la muerte descendente en mango (Junaid *et al.*, 2020).

(Nalin *et al.*, 2019; Reveglia *et al.*, 2020). In the present study, the filtrate of *L. pseudotheobromae* S10 significantly inhibited *P. mangiferae* MN2. There are various reports of species of the genus *Lasiodiplodia* that produce mellein, an antifungal phenolic compound that causes cell lysis, inhibiting conidia germination and mycelial growth in various fungi (Qian *et al.*, 2014; Cimmino *et al.*, 2017; Morales-Sánchez *et al.*, 2021) such as *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva* and *Lasiodiplodia theobromae* (Wang *et al.*, 2014; Abro *et al.*, 2019). Studies of fungal filtrates focused on the control of phytopathogens could provide useful alternatives if their active compounds, metabolic production, fungicidal and/or fungistatic capacity, among others, are characterized (Pradeep *et al.*, 2013). This deserves special attention since the dual culture assay showed no evidence of antagonism. This could be attributed to an increase in the production of antifungal metabolites in liquid culture medium compared to the solid culture medium, as has been observed in other species (Pradeep *et al.*, 2013). Another probable explanation could be the decrease or suppression from metabolites of *L. pseudotheobromae* when it recognizes *P. mangiferae*. The development in solid medium and in the branches was the same, corroborating the interaction between both species. The present study opens an opportunity to address the importance of secondary metabolites produced during interaction with various dieback-causing species.

In recent years, various studies have focused on investigating plant diseases caused by co-infections of phytopathogenic fungi and their interactions with the host (Susi *et al.*, 2015; Lerch-Olson and Robertson, 2020; Hoffmann *et al.*, 2021). Mango branches co-inoculated with *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae* exhibited greater severity of dieback overall compared to individual infections. Fungal interactions are complex and involve

Diversos hongos fitopatógenos producen compuestos antifúngicos como fenoles, terpenos y flavonoides capaces de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos incluidos los hongos lo que se ha utilizado como estrategia biotecnológica de control (Nalin *et al.*, 2019; Reveglia *et al.*, 2020). En nuestro estudio, el filtrado de *L. pseudotheobromae* S10 inhibió significativamente a *P. mangiferae* MN2. Existen diversos reportes donde especies del género *Lasiodiplodia* producen melleína, compuesto fenólico antifúngico que provoca lisis celular, inhibiendo la germinación de conidios y el crecimiento micelial de diversos hongos (Qian *et al.*, 2014; Cimmino *et al.*, 2017; Morales-Sánchez *et al.*, 2021), como *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva* y *Lasiodiplodia theobromae* (Wang *et al.*, 2014; Abro *et al.*, 2019). Los estudios de los filtrados de hongos enfocados al control de fitopatógenos pueden ser una alternativa si se caracterizan sus compuestos activos, producción metabólica, su capacidad fungicida y/o fungistático, entre otros (Pradeep *et al.*, 2013). Esto resulta de especial atención, pues en los cultivos duales no se observó ningún aspecto de antagonismo, esto podría atribuirse un aumento en la producción de metabolitos antifúngicos en medio de cultivo líquido en comparación de sólido como se ha observado en otras especies (Pradeep *et al.*, 2013). Otra probable explicación podría añadirse a la disminución o supresión de metabolitos de *L. pseudotheobromae* cuando reconoce a *P. mangiferae*. Así mismo el desarrollo en medio sólido y en ramas fue el mismo corroborando la interacción entre ambas especies. Esta investigación abre una oportunidad para abordar los metabolitos secundarios producidos durante la interacción con diversas especies causantes de la enfermedad de la muerte descendente.

En los últimos años, diversos estudios se han enfocado a investigar las enfermedades vegetales provocadas por co-infecciones de hongos fitopatógenos

processes of mutualism, antagonism, coexistence, among others (Fang *et al.*, 2021). In addition, the severity of diseases caused by co-infections of phytopathogens depends on various factors, mainly growth rate, virulence, metabolite production, interactions, host, among others (Müller *et al.*, 2012; Boddy, 2016; Luo *et al.*, 2017). Future studies will aim to analyze the fungal-host pathosystem and develop integrated management strategies for dieback.

CONCLUSIONS

The present study provides the first report of the causal agents associated with dieback in Manila mango trees in the state of Veracruz. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *Pestalotiopsis mangiferae* were morphologically and molecularly identified based on the results obtained in the field and in the laboratory. In co-infection, the disease lesion area was larger in branches co-inoculated with *L. pseudotheobromae* and *P. mangiferae*, compared to individual infections. *P. mangiferae* filtrates had no effect on the growth of *L. pseudotheobromae*, while *L. pseudotheobromae* filtrates had an inhibitory effect on *P. mangiferae* growth.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to the Mango Product System (Sistema Producto Mango) of the state of Veracruz, in particular to Ing. Guillermo Palmeros Marín. To the Universidad Veracruzana for financing this project through the UN 2030 Agenda for Sustainable Development with the project "Alternatives for production management through biological control of phytopathogenic fungi that cause the decline of mango trees in Actopan,

y sus interacciones con el hospedero (Susi *et al.*, 2015; Lerch-Olson y Robertson, 2020; Hoffmann *et al.*, 2021). Las ramas de mango co-inoculadas con *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae* presentaron una mayor severidad de la muerte descendente en conjunto en comparación con las infecciones individuales. Las interacciones fúngicas son complejas e involucran procesos de mutualismo, antagonismo, coexistencia, entre otros (Fang *et al.*, 2021). Además, la severidad de las enfermedades provocadas por co-infecciones de fitopatógenos depende de diversos factores, destacando la tasa de crecimiento, virulencia, producción de metabolitos, interacción, hospedero, entre otros (Müller *et al.*, 2012; Boddy, 2016; Luo *et al.*, 2017). A futuro se propone investigar el patosistema hongos-hospedero y desarrollar estrategias de manejo integrado de la muerte descendente.

CONCLUSIONES

Este estudio aporta el primer reporte de los agentes causales asociados a la muerte descendente en mango var. Manila en el estado de Veracruz. A partir de los resultados obtenidos en campo y en laboratorio, se identificó de manera morfológica y molecular a *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Pestalotiopsis mangiferae*. En la co-infección el área de lesión de la enfermedad fue mayor en las ramas co-inoculadas con *L. pseudotheobromae* y *P. mangiferae*, en comparación con las infecciones individuales. Los filtrados de *P. mangiferae* no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *L. pseudotheobromae*, mientras que los filtrados de *L. pseudotheobromae* tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. mangiferae*.

Veracruz. To the National Council of Science and Technology (CONACyT) for the scholarship granted number 764501.

CITED LITERATURE

- Abdullah AS, Moffat CS, Lopez-Ruiz FJ, Gibberd MR, Hamblin J, and Zerihun A. 2017. Host–multi-pathogen warfare: Pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in Plant Science* 8: 1806. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>
- Abdullah AS, Turo C, Moffat CS, Lopez-Ruiz FJ, Gibberd MR, Hamblin J, and Zerihun A. 2018. Real-time PCR for diagnosing and quantifying co-infection by two globally distributed fungal pathogens of wheat. *Frontiers in Plant Science* 1086. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01086>
- Abro MA, Sun X, Li X, Jatoi GH and Guo LD. 2019. Biocontrol potential of fungal endophytes against *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum causing wilt in cucumber. *The Plant Pathology Journal* 235(6):598-608. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.05.2019.0129>
- Al-Adawi A, Deadman M, Al-Rawahi A, Al-Maqbali Y, Al-Jahwari A, Al-Saadi B, Al-Amri I, and Wingfield M. 2006. Aetiology and causal agents of mango sudden decline disease in the Sultanate of Oman. *European Journal of Plant Pathology* 116(4): 247-254. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9056-x>
- Al-Saadoon, AH, Ameen M, Hameed M, and Al-Badran A. 2012. Histopathology of grapevine inoculated with *Lasiodiplodia theobromae*. *Basrah Journal of Agricultural Sciences* 25(1):1-12. <https://doi.org/10.33762/bagrs.2012.54726>
- Altendorf S. 2019. Major tropical fruits market review. 2017. Rome, FAO. 10 pp. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- Boddy, L. 2016. Chapter 10—Interactions between fungi and other microbes. En S. C. Watkinson, L. Boddy, y N. P. Money (Eds.), *The Fungi* (Third Edition). Academic Press. pp. 337-360. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00010-4>
- Borrero C, Castaño R and Avilés M. 2018. First report of *Pestalotiopsis clavisporea* (*Neopestalotiopsis clavisporea*) causing canker and twig dieback on blueberry bushes in Spain. *Plant Disease* 102(6), 1178-1178. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1529-PDN>
- Chen F, Lu L, Ni H, Wang Y, Wang Y and Li G. 2012. First report of *Pestalotiopsis mangiferae* and *P. vismiae* causing twig dieback of *Myrica rubra* in China. *Plant Disease* 96(4): 588-588. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1054-PDN>
- Cimmino A, Cinelli T, Masi M, Reveglia P, da-Silva MA, Mugnai L, Michereff SJ, Surico G, and Evidente A. 2017. Phytotoxic lipophilic metabolites produced by grapevine strains of *Lasiodiplodia* species in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(6): 1102-1107. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04906>
- Clendenin I. 1896. *Lasiodiplodia* E. and E., n. gen. *Botanical Gazette* 21(2): 92-92. <https://doi.org/10.1086/327307>
- de-Oliveira CVS, Michereff SJ, Martins RB, Gava CAT, Mizubuti ESG and Câmara MPS. 2010. Species of

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Sistema Producto Mango del estado de Veracruz en particular al Ing. Guillermo Palmeros Marín. A la Universidad Veracruzana por el financiamiento de este proyecto a través de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible de la ONU con el proyecto “Alternativas para el manejo de la producción a través del control biológico de hongos fitopatógenos causantes del declive de árboles de mango en Actopan, Veracruz”. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada número 764501.

Fin de la versión en Español

- Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 127(4): 509-519. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9616-y>
- Elqassas R, and Abu-Naser SS. 2018. Expert system for the diagnosis of mango diseases. *International Journal of Academic Engineering Research* 2(8): 10-18
- Fan S, Huang Y, Zhang X, Chen G, Zhou J, Li X, and Han M. 2019. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing canker on *Cotinus coggygria* in China. *Plant Disease* 103(10): 2678-2678. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0690-PDN>
- Fang X, Zhang C, Wang Z, Duan T, Yu B, Jia X, Pang J, Ma L, Wang Y, and Nan Z. 2021. Co-infection by soil-borne fungal pathogens alters disease responses among diverse alfalfa varieties. *Frontiers in Microbiology* 12: 664385-664385. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664385>
- Hajieghrari B, Torabi-Giglou M, Mohammadi MR, and Davari M. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology* 7(8). <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Hoffmann A, Lischeid G, Koch M, Lentzsch P, Sommerfeld T, and Müller MEH. 2021. Co-cultivation of *Fusarium*, *Alternaria*, and *Pseudomonas* on wheat-Ears affects microbial growth and mycotoxin production. *Microorganisms* 9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020443>
- Ismail AM, Cirvilleri G, Polizzi G, Crous PW, Groenewald JZ and Lombard L. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology* 41(6): 649-660. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0163-1>
- Jackson DSM and Johnson-Cicalese J. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology* 78 237-239. <https://doi.org/10.1094/Phyto-78-237>

- Junaid M, Purwantara A and Guest D. 2020. First report of vascular streak dieback symptom of cocoa caused by *Ceratobasidium theobromae* in Barru District, South Sulawesi. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 486(1): 012170. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/486/1/012170/pdf>
- Khaskheli M, Jiskani M, Soomro M, Talpur M and Poussio G. 2011. Prevalence of mango Sudden decline/death syndrome (MSDS) on various varieties at the orchards of different age in the Vicinity of Tando Qaiser, Hyderabad, Sindh. Pakistan Journal of Agriculture Agricultural Engineering and Veterinary Sciences 27(2): 160-167
- Kim H, Castellon-Chicas MJ, Arbizu S, Talcott S, Drury NL, Smith S and Mertens-Talcott S. U. 2021. Mango (*Mangifera indica* L.) Polyphenols: Anti-Inflammatory Intestinal Microbial Health Benefits, and Associated Mechanisms of Actions. Molecules 26(9): 2732. <https://doi.org/10.3390/molecules26092732>
- Kwon JH, Choi O, Kang B, Lee Y, Park J, Kang DW, Han I and Kim J. 2017. Identification of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing mango dieback in Korea. Canadian Journal of Plant Pathology 39(2): 241-245. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1329231>
- Lawrence DP, Travadon R, and Baumgartner K. 2018. Novel *Seimatosporium* species from grapevine in northern California and their interactions with fungal pathogens involved in the trunk-disease complex. Plant Disease 102(6): 1081-1092. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1247-RE>
- Lee SB. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press. 282-7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50038-X>
- Lerch-Olson ER and Robertson AE. 2020. Effect of co-inoculations with *Pythium* and *Fusarium* species on seedling disease development of soybean. Canadian Journal of Plant Pathology 42(3): 408-418. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1668858>
- Li L, Mohd MH, Mohamed NN, Subramaniam S and Latiffah Z. 2021. Identification of Botryosphaeriaceae associated with stem-end rot of mango (*Mangifera indica*) in Malaysia. Journal of Applied Microbiology 130(4): 1273-1284. <https://doi.org/10.1111/jam.14828>
- Liu H, Macdonald CA, Cook J, Anderson IC and Singh BK. 2019. An ecological loop: host microbiomes across multitrophic interactions. Trends in Ecology and Evolution 34(12): 1118-1130. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.07.011>
- Luo F, Zhong Z, Liu L, Igarashi Y, Xie D and Li N. 2017. Metabolomic differential analysis of interspecific interactions among white rot fungi *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens* and *Pleurotus ostreatus*. Scientific Reports 7(1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05669-3>
- Manter DK and Vivanco JM. 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. Journal of Microbiological Methods 71(1): 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.016>
- Maharachchikumbura SS, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J and Crous PW. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. Studies in Mycology 79: 121-186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Marques MW, Lima NB, de-Morais MA, Barbosa MAG, Souza BO, Michereff SJ, Phillips AJL and Câmara MPS. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. Fungal Diversity 61(1): 181-193. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0231-z>
- Morales-Sánchez V, Díaz CE, Trujillo E, Olmeda SA, Valcarcel F, Muñoz R and González-Coloma A. 2021. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. SPH2. Journal of Fungi 7(2):109. <https://doi.org/10.3390/jof7020109>
- Müller M, Steier I, Köppen R, Siegel D, Proske M, Korn U and Koch M. 2012. Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. Journal of Applied Microbiology 113(4): 874-887. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05388.x>
- Nalin Rathnayake GR, Savitri KN, Jayasinghe L, Araya H and Fujimoto Y. 2019. Secondary metabolites produced by an endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. Natural Products and Bioprospecting 9(6): 411-417. <https://doi.org/10.1007/s13659-019-00225-0>
- Naglot A, Goswami S, Rahman I, Shrimali DD, Yadav KK, Gupta VK, Rabha AJ, Gogoi HK and Vee V. 2015. Antagonistic potential of native *Trichoderma viride* strain against potent tea fungal pathogens in North East India. The Plant Pathology Journal 31(3): 278-289. PubMed. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2015.0004>
- Orton ES and Brown JKM. 2016. Reduction of growth and reproduction of the biotrophic fungus *Blumeria graminis* in the presence of a necrotrophic pathogen. Frontiers in Plant Science 7: 742. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00742>
- Pradeep FS, Begam MS, Palaniswamy M and Pradeep BV. 2013. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. World Applied Sciences Journal 22(1):70-77. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.22.01.7265>
- Qian CD, Fu YH, Jiang FS, Xu ZH, Cheng DQ, Ding B, Gao CX and Ding ZS. 2014. *Lasiodiplodia* sp. ME4-2, an endophytic fungus from the floral parts of *Viscum coloratum*, produces indole-3-carboxylic acid and other aromatic metabolites. BMC Microbiology 14: 297. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0297-0>
- Qian YX, Kang JC, Luo YK, Yang XB, He J and Wang L. 2021. Secondary metabolites from endophytic *Pestalotiopsis microspora* and their P-Glycoprotein inhibitory activity. Chemistry of Natural Compounds 57(5): 924-926. <https://doi.org/10.1007/s10600-021-03513-9>
- Rakesh A, Mishra JP, Prasad R, Sekhar JC, Gupta D, Reddy VP and Kumar S. 2020. Isolation and *in vitro* evaluation of fungicides against *Pestalotiopsis mangiferae* causing grey blight of mango. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 9(4): 1368-1370. <https://www.phytojournal.com/archives/2020/vol9issue4/PartS/9-4-145-386.pdf>
- Reveglia P, Masi M and Evidente A. 2020. Melleins-Intriguing natural compounds. Biomolecules 10(5): 772. <https://doi.org/10.3390/biom10050772>
- Rodríguez-Gálvez E, Guerrero P, Barradas C, Crous PW and Alves A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of

- Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology* 121(4): 452-465. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
- Rodríguez-Gálvez E, Hilário S, Lopes A and Alves A. 2020. Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. *European Journal of Plant Pathology* 157(1): 89-102. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01983-1>
- Sakalidis ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GE and Burgess TI. 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology* 130(3): 379-391. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9760-z>
- Salvatore MM, Alves A and Andolfi A. 2020. Secondary metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, chemical diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Toxins* 12(7): 457. <https://doi.org/10.3390/toxins12070457>
- Sandoval-Sánchez M, Nieto-Ángel D, Sandoval-Islas JS, Téliz-Ortiz D, Orozco-Santos M and Silva-Rojas H. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica*). *Agrociencia* 47(1): 61-73. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n1/v47n1a6.pdf>
- Santos J, Hilário S, Pinto G and Alves A. 2021. Diversity and pathogenicity of pestalotioid fungi associated with blueberry plants in Portugal, with description of three novel species of *Neopestalotiopsis*. *European Journal of Plant Pathology* 162(3): 39-555. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02419-0>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). 2020. El rey de las frutas tropicales: Mango. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-rey-de-las-frutas-tropicales-mango>
- Singh HB. 2006. *Trichoderma*: A boon for biopesticides industry. *J Mycology Plant Pathology* 36: 373-384
- Susi H, Barrès B, Vale PF and Laine AL. 2015. Co-infection alters population dynamics of infectious disease. *Nature Communications* 6: 5975. <https://doi.org/10.1038/ncomms6975> (2015)
- Swaroop A, Bagchi M, Moriyama H and Bagchi D. 2018. Health Benefits of mango (*Mangifera indica*) and mangiferin. *Japan Journal of Medicine* 1(2):149-154. <https://japanjournalofmedicine.com/health-benefits-of-mango-mangiferaindica-l-and-mangiferin/>
- Tollenaere C, Susi H and Laine AL. 2016. Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends in Plant Science* 21(1): 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.014>
- Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Guerrero JC, Guevara J and Gubler WD. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease* 92(4): 519-529. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-4-0519>
- Wang J, Wang G, Zhang Y, Zheng B, Zhang C and Wang L. 2014. Isolation and identification of an endophytic fungus *Pezicula* sp. in *Forsythia viridissima* and its secondary metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(10): 2639-2644. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1686-0>