

Diaporthe sp. and *Lasiodiplodia* sp.: New foliar pathogens in cuajinicuil and soursop in Oaxaca, Mexico

Diaporthe sp. y *Lasiodiplodia* sp.: nuevos patógenos foliares de cuajinicuil y guanábana en Oaxaca, México

Javier Castillo-Cabrera, ¹Instituto Tecnológico del Valle de Etila, Nudo San Sebastián Nopalera, Oaxaca, CP 71162, México; **Román González-Escobedo**, Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Periférico Francisco R. Almada km 1, Chih, Chihuahua, CP 31453, México; **Noé Bautista-Hernández**¹, **José Luis Barrios-Bautista**¹, **Graciela Dolores Ávila-Quezada**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas. Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Campus I s/n, Chih., Chihuahua, CP 31350, México; **Laila Nayzzel Muñoz-Castellanos***, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Campus II Circuito Universitario s/n, Chih., Chihuahua, CP 31125, México.

*Corresponding autor: lmunoz@uach.mx

Received: January 13, 2023.

Accepted: April 24, 2023.

Castillo-Cabrera J, González-Escobedo R, Bautista-Hernández N, Barrios-Bautista JL, Ávila-Quezada GD and Muñoz-Castellanos LN. 2023. *Diaporthe* sp. and *Lasiodiplodia* sp.: New foliar pathogens in cuajinicuil and soursop in Oaxaca, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 298-309.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2301-1>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

Abstract. Cuajinicuil (*Inga spuria*) and soursop (*Annona muricata*) fruit trees presented leaf spots that reached a severity of 50% in June 2019. The present study was established with the aim of identifying through ITS the fungi of the foliage of both trees. For this purpose, 10 orchards per fruit tree were selected in Peña Negra, Santa Lucía Monteverde, Oaxaca, Mexico, where five

Resumen. Los árboles frutales de cuajinicuil (*Inga spuria*) y guanábana (*Annona muricata*) presentaron manchas foliares que alcanzaron una severidad del 50% en junio del 2019. El presente estudio se estableció con el objetivo de identificar a través de la secuenciación del ITS a los hongos asociados al follaje de ambos árboles. Para ello se seleccionaron 10 huertas por frutal en Peña Negra, Santa Lucía Monteverde, Oaxaca, México, en donde se colectaron cinco hojas sintomáticas por huerta. Los hongos aislados de cuajinicuil presentaron conidios ovoides, aseptados y hialinos. Los conidios aislados de guanábana fueron subovoides a elipsoidales, con ápices redondeados, hialinos y aseptados (inmaduros), con un septo y color café (maduros). Los postulados de Koch se realizaron en hojas sanas de ambos frutales, en 10 cámaras húmedas por frutal. Una vez demostrada su patogenicidad se identificaron molecularmente. En cuajinicuil se identificó a *Diaporthe* sp. (NCBI:

symptomatic leaves per orchard were collected. Fungi isolated from cuajinicuil presented ovoid, aseptate and hyaline conidia. The conidia isolated from soursop were subovoid to ellipsoidal, with rounded apices, hyaline and aseptate (immature), with a septum and brown in color (mature). Koch's postulates were carried out on healthy leaves of both fruit trees, in 10 moist chambers per each. Once their pathogenicity was demonstrated, isolates were identified. In cuajinicuil *Diaporthe* sp. (NCBI: MW418007) and in soursop to *Lasiodiplodia* sp. (NCBI: MW418003) were identified. These species are reported for the first time in the fruit trees of this community. These findings represent a scientific contribution for the benefit of small agricultural communities in Mexico.

Keywords: *Inga spuria*, *Annona muricata*, Internal transcribed spacer (ITS), *Diaporthe*, *Lasiodiplodia*.

Most of the rural communities in Oaxaca, Mexico, currently maintain elements from prehispanic agricultural systems, such as the organization that promotes community work and the production of local crops. Fruit trees such as *Inga spuria* (cuajinicuil) and *Annona muricata* (soursop) are among the main socially and economic important species grown in the community of Peña Negra, in the county of Santa Lucía Monteverde, Oaxaca. The community is located at an altitude of 1200 masl, its average temperature is 26 °C and a relative humidity varies between 50 and 90% throughout the years. The production of soursop in Peña Negra is of 0.25 t a year, and for cuajinicuil, 0.5 t a year. This production is for self-supply and is also sold in the local market.

In June, 2019, these two fruit trees first displayed fungal symptoms on leaves, causing heavy defoliation, mummification and loss of fruits, with

MW418007) y en guanábana a *Lasiodiplodia* sp. (NCBI: MW418003). Estas especies se reportan por primera vez en los árboles frutales de esta comunidad. Estos hallazgos representan un aporte científico en beneficio de pequeñas comunidades agrícolas de México.

Palabras clave: *Inga spuria*, *Annona muricata*, región espaciadora transcrita interna (ITS), *Diaporthe*, *Lasiodiplodia*.

En la actualidad, la mayoría de las comunidades rurales de Oaxaca, México mantienen elementos de los sistemas agrícolas prehispánicos tales como la organización que promueve el trabajo comunitario y la producción de cultivos locales. Frutales como *Inga spuria* (cuajinicuil) y *Annona muricata* (guanábana) son de las principales especies de importancia social y económica que se cultivan en la comunidad de Peña Negra, municipio de Santa Lucía Monteverde, Oaxaca. La comunidad está localizada a una altitud de 1200 msnm, tiene temperaturas promedio de 26 °C y humedad relativa que varía de 50 a 90% a lo largo del año. La producción de guanábana es de 0.25 t anuales y de cuajinicuil 0.5 t por año en Peña Negra. Esta producción se destina para autoconsumo y se comercializa en el mercado local.

En junio de 2019 en estos dos frutales se observaron por primera vez síntomas foliares fúngicos causando fuerte defoliación, momificación y caída del fruto, con una incidencia del 100%, es decir, todos los árboles tenían hojas enfermas. En un recorrido en las siete rancherías de San Sebastián, Nopalera: El paraíso 16° 95' 27'' N, 97° 82' 11'' O, El guayabo 16° 92' 33'' N, 97° 78' 13'' O, Buena Vista el Naranjo 16° 92' 75'' N, 97° 76' 69'' O, Peña Flor de Clavo 16° 90' 19'' N, 97° 77' 91'' O, Peña Negra 16° 91' 52'' N, 97° 79' 50'' O, Torralba

an incidence of 100%, meaning that all trees had diseased leaves. In a tour of the seven *rancherías* of San Sebastián, Nopalera (El paraíso 16° 95' 27'' N, 97° 82' 11'' W, El guayabo 16° 92' 33'' N, 97° 78' 13'' W, Buena Vista el Naranjo 16° 92' 75'' N, 97° 76' 69'' W, Peña Flor de Clavo 16° 90' 19'' N, 97° 77' 91'' W, Peña Negra 16° 91' 52'' N, 97° 79' 50'' W, Torralba de Juárez 16° 90' 47'' N, 97° 82' 19'' O, and Peña de Jícara 16° 93' 86'' N, 97° 79' 50'''), the same symptoms were observed in both fruit tree species.

A part of Putla (a district that spans 50 communities and several municipal areas) was also visited, and the same symptoms were also observed in soursop and cuajinicuil in these communities, namely Yosotiche, Simiyuvi and El Piñal. Each *ranchería* has its own microclimate and the pathogens have seemed to adapt to them all. Out of all the families in the area, 95% have few trees planted in their backyards. The remaining 5% has between 50 and 100 of both types of fruit trees. In diseased trees, losses can be of up to 50%, according to information provided by local farmers. In order to understand this phytosanitary problem, the aim of this study was to identify, by amplification and analysis of the region of the Internal Transcribed Spacer (ITS), the fungi associated to the foliage of the cuajinicuil and soursop.

The diseased plant tissue samples were collected from cuajinicuil and soursop trees in December, 2019, in 10 orchards in Peña Negra, San Sebastián Nopalera, in the county of Santa Lucía Monteverde, Oaxaca, Mexico (16° 54' 52.73'' N; 97° 47' 50.35'' W; 1096 masl). The location has an average temperature of 26 °C and the relative humidity between May and October fluctuates between 80 and 90%.

The trees were in a vegetative phenological stage. The orchards chosen had 1 ha for every kind of fruit tree to carry out the sampling. In each orchard,

de Juárez 16° 90' 47'' N, 97° 82' 19'' O, y Peña de Jícara 16° 93' 86'' N, 97° 79' 50'', se observaron los mismos síntomas en ambos frutales.

También se recorrió parte de Putla (distrito que abarca a 50 comunidades y diversos municipios) y se observaron los mismos síntomas en guanábana y cuajinicuil en las comunidades visitadas: Yosotiche, Simiyuvi y El Piñal. Cada *ranchería* tiene su propio microclima y al parecer los patógenos se han adaptado a todos. El 95% de las familias tienen pocos árboles como cultivos de traspatio. El 5% restante tiene entre 50 a 100 árboles de ambos frutales. En los árboles enfermos las pérdidas pueden alcanzar un 50% de acuerdo con información personal de los productores. Con la finalidad de atender este problema fitosanitario, el objetivo de este trabajo fue identificar a través de la amplificación y análisis de la región espaciadora transcrita interna (ITS) los hongos asociados al follaje de cuajinicuil y guanábana.

Las muestras de tejido vegetal enfermo se recolectaron de árboles de cuajinicuil y guanábana en diciembre de 2019, en 10 huertas en la *ranchería* de Peña Negra, San Sebastián Nopalera, municipio de Santa Lucía Monteverde, Oaxaca, México (16° 54' 52.73'' N; 97° 47' 50.35'' O; 1096 msnm). La localidad tiene una temperatura promedio de 26 °C y la humedad relativa entre mayo y octubre oscila entre 80 a 90%.

Los árboles se encontraban en etapa fenológica vegetativa. Se seleccionaron huertas de 1 ha por frutal para realizar los muestreos. En cada huerta se estableció un diseño de muestreo aleatorio de 10 árboles con síntomas foliares. De cada árbol se recolectaron al azar a una altura de 1.5 m, cinco hojas con síntomas. Para aislar los microorganismos, después de enjuagar las hojas en el laboratorio, porciones de 0.5 x 0.5 cm tomados del margen de la lesión se sumergieron por 1 min en hipoclorito de sodio al 2%, se enjuagaron tres veces, y se colocaron

a randomized sampling design was established consisting of 10 trees with leaf symptoms. Five leaves with symptoms were taken from each tree at a height of 1.5 m. To isolate the microorganisms, after rinsing the leaves in the lab, pieces measuring 0.5 x 0.5 cm were taken from the edge of the lesions and submerged in 2% sodium hypochlorite, rinsed three times and placed in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA; BD Bioxon) and incubated at 27 °C for seven days. From the fungal growth, hypha tips were replanted until pure cultures were obtained from each isolation.

The pathogenicity tests were carried out in 10 healthy soursop plants, placing them in 10 humid chambers, separately, and keeping them at 25 °C. Each one was inoculated placing a disc, 5 mm in diameter. The negative control was inoculated with sterile distilled water and monitored until symptoms appeared.

In cuajinicuil, to verify the pathogenicity of the isolation, the previously described methodology was followed. In addition, leaves from 10 plants at a height of 30 cm were inoculated, one leaf per plant, which were kept at a temperature of 25 °C and the humidity was maintained with moistened cotton inside the humid chambers. Once the symptoms appeared, the pathogens were isolated from the diseased tissue in the PDA. The two fungi isolated from each tree were morphologically different, therefore the sequencing of each one's ITS was carried out.

The genomic DNA was extracted from the mycelial growth of the pure culture of each isolation using the kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA), following the manufacturer's protocol. The concentration and purity of the DNA was verified in a Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA); the integrity was determined by electrophoresis in a 1% agarose

en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA; BD Bioxon) y se incubaron a 27 °C por siete días. A partir del crecimiento fúngico se hicieron resiembras de punta de hifa hasta obtener cultivos puros de cada aislado.

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en 10 hojas de guanábana sanas, colocándolas en 10 cámaras húmedas por separado, manteniéndolas a 25 °C. Cada una de ellas se inoculó colocando un disco con micelio de 5 mm de diámetro. El control negativo se inoculó con agua destilada estéril y se monitorearon hasta la aparición de síntomas.

En cuajinicuil, para verificar la patogenicidad del aislado se siguió la metodología anteriormente descrita. Además, se inocularon hojas de 10 plantas de 30 cm de altura. Una hoja por planta, las cuales se mantuvieron a una temperatura de 25 °C y la humedad se mantuvo con algodón húmedo dentro de las cámaras húmedas. Una vez que aparecieron los síntomas, a partir del tejido enfermo se aislaron los patógenos en PDA. Los dos hongos aislados de cada cultivo fueron diferentes morfológicamente, por lo tanto, se realizó la secuenciación del ITS de cada uno.

El ADN genómico se extrajo a partir del crecimiento micelial de los cultivos puros de cada aislado con el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA) siguiendo el protocolo del proveedor. La concentración y pureza del ADN se verificó en un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA); la integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher, Darmstadt, Alemania).

La región ITS se amplificó con los iniciadores universales ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) en un termociclador Bio-Rad T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

gel stained with SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher, Darmstadt, Germany).

The ITS region was amplified with universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) in a T100 Bio-Rad thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a total reaction volume of 25 μ L, containing 50-100 ng of genomic DNA, 0.4 μ M of each primer and 1X of Platinum Green Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reaction conditions were as follows: initial denaturalization at 95 °C for 5 min, 30 cycles at 95 °C for 1 min, aligning at 55 °C for 2 min, extension at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 5 min. The expected fragment (550 pairs of bases) was corroborated by electrophoresis in 1% agarose gel and purified using the ZR DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA). The purified products of PCR were sequenced using Sanger's technique by Macrogen, Inc. (South Korea).

The sequences from this study were compared individually with reference sequences from the GenBank data base (NCBI) with the program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Later, the program Clustal X v2.1 was used to carry out the multiple sequence alignment. Once aligned, 5' and 3' were timed using SeaView v4.4.2 and the best nucleotide substitution model was determined using the program SMS (Smart Model Selection) incorporated in PhyML v3.0. A phylogenetic tree was calculated using the maximum likelihood method in PhyML v3.0 with the model TN93. The reliability of each node was estimated using a bootstrap analysis after 1000 replications and the sequence of *Alternaria alternata* KX377683.1 was included as an external group. The generated tree was visualized with the program iTOL (Interactive Tree of Life).

en un volumen total de reacción de 25 μ L, conteniendo 50-100 ng de ADN genómico, 0.4 μ M de cada iniciador y 1X de Platinum Green Hot Start PCR Master Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 30 ciclos a 95 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 2 min, extensión a 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C por 5 min. El fragmento esperado (550 pares de bases) se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificó con el kit ZR DNA Sequencing Clean-up Kit (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA). Los productos purificados de PCR se secuenciaron por la técnica de Sanger, por la empresa Macrogen, Inc. (Corea del Sur).

Las secuencias de este estudio, se compararon individualmente con secuencias de referencia de la base de datos del GenBank (NCBI) con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente, el programa Clustal X v2.1 se utilizó para realizar el alineamiento múltiple de secuencias. Una vez alineadas, se recortaron de sus extremos 5' y 3' con SeaView v4.4.2 y se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica con el programa SMS (Smart Model Selection) incorporado en PhyML v3.0. Un árbol filogenético se calculó con el método de máxima verosimilitud en PhyML v3.0 con el modelo TN93. La confiabilidad de cada nodo se estimó por medio de análisis de bootstrap después de 1000 réplicas y se incluyó la secuencia de *Alternaria alternata* KX377683.1 como grupo externo. El árbol generado se visualizó en el programa iTOL (Interactive Tree of Life).

En cuajinicuil, los síntomas de la enfermedad fueron manchas pequeñas redondas a irregulares, de color castaño claro a oscuro con halo clorótico, sobre cualquier parte del foliolo. Las manchas se presentan en agrupaciones que llegan a formar pequeñas áreas de tejido necrosado. Las lesiones abarcan más del 50% del foliolo, finalmente las

In the cuajinicuil, the symptoms of the disease were small round to irregular spots with a light to dark chestnut color and a chlorotic halo on any part of the leaflet. The spots appeared in clusters that formed small areas of necrotized tissue. The lesions cover over 50% of the leaflet, and finally, the leaves become yellow and fall (Figure 1). The foliar symptoms in soursop have a brown color with irregular yellow edges that begin at the tip and spread towards the base of the leaflet. The necrotized tissue becomes brittle, followed by the wilting of the leaves, which then become brown, with an appearance of having been burned by fire. The branches become completely defoliated.

hojas se tornan amarillas y se defolian (Figura 1). Los síntomas foliares en guanábana tienen una coloración marrón con margen amarillo, irregulares, inician en la punta y avanzan hacia la base del foliolo. El tejido necrosado se vuelve quebradizo, después las hojas se marchitan, se tornan cafés con apariencia de quemadura por fuego. Las ramas se defolian por completo.

En cuajinicuil, el hongo sujeto a los postulados de Koch indujo síntomas a los 13 días después de la inoculación en plantas, mientras que en hojas desprendidas los síntomas se presentaron 10 días después de ser inoculadas. Las hojas presentaron manchas redondas a irregulares amarillentas



Figure 1. Leaf symptoms in fruit trees in the community of San Sebastián Nopalera, Oaxaca, Mexico. A-B. Symptoms of necrotic leaf in Cuajinicuil trees; C. Defoliation in cuajinicuil; D-E-F. Symptoms of lesions with yellowing and brown spots in soursop trees.

Figura 1. Síntomas foliares en árboles frutales de la comunidad de San Sebastián Nopalera, Oaxaca, México. A-B. Síntomas de necrosamiento foliar en árboles de Cuajinicuil; C. Defoliación en cuajinicuil; D-E-F. Síntomas de lesiones con amarillamiento y puntos de color café en árboles de Guanábana.

In cuajinicuil, the fungus subjected to Koch's postulates induced symptoms 13 days after inoculation in plants, whereas in loose leaves, the symptoms appeared 10 days after inoculation. The leaves displayed round to irregular yellowish spots, characteristic of the original disease. When the fungi of both tests were reisolated, they were confirmed to be similar to the initially isolated fungi. The 8.5 cm growth of the culture was achieved in seven days. The culture's characteristics are described in Table 1.

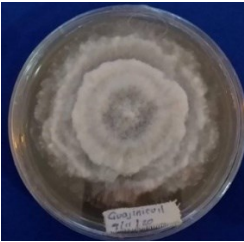

For soursop, the inoculated fungus induced similar symptoms to those initially observed in the field, 10 days after inoculation. The spots were maroon with yellow edges and irregularly shaped. When reisolating, the fungus displayed similarity with the initially isolated fungi. The culture's growth characteristics (Table 1) coincide with those reported by Picos-Muñoz *et al.* (2015) described for the fungus *Lasiodiplodia theobromae* obtained from papaya.

características de la enfermedad original inicial. Al reaislar los hongos de ambas pruebas se confirmó que fueron similares a los hongos aislados inicialmente. El crecimiento de 8.5 cm de la colonia se logró en siete días. Las características de la colonia se describen en el Cuadro 1.

En guanábana, el hongo inoculado indujo síntomas similares a los observados en inicialmente en campo, 10 días después de la inoculación. Las manchas fueron color marrón con margen amarillo e irregulares. En el reaislamiento, el hongo mostró similitud con el aislado inicialmente. Las características del crecimiento de la colonia (Cuadro 1) coinciden con las reportadas por Picos-Muñoz *et al.* (2015) descritas para el hongo *Lasiodiplodia theobromae* obtenido de papaya.

Los hongos aislados de cuajinicuil presentaron conidios ovoides, aseptados y hialinos, mientras que los conidios del hongo de guanábana fueron subovoideos a elipsoidales, con ápices redondeados, hialinos y aceptados (inmaduros), con un septo y color café (maduros).

Table 1. Nomenclature, taxonomic assignment and characteristics of the cuajinicuil and soursop pathogenic fungi.
Cuadro 1. Nomenclatura, asignación taxonómica y características de los hongos patógenos de cuajinicuil y guanábana.

Fruit tree	Strain/NCBI accession number	Genus	Culture characteristics	Colonies in PDA
Cuajinicuil	HCUA1/MW418007	<i>Diaporthe</i> sp. (Sordariomycetes, Diaporthaceae)	Aerial mycelia growth in cream concentric rings with lobulated edge and the vegetative growth in gray. After few days, mycelium becomes cottony and dense, grayish sepia color on the reverse	
Soursop	HGUA1/MW418003	<i>Lasiodiplodia</i> sp. (Dothideomycetes, Botryosphaeriaceae)	White dense aerial mycelia. Few days later, the mycelia turns olive gray to dark gray.	

The fungi isolated from cuajinicuil displayed ovoid, septated and hyaline conidia, whereas the conidia of the fungus found in soursop were subovoidal to ellipsoidal, with rounded, hyaline and aseptate apices (immature), with a septum and brown in colored (mature).

The DNA sequences obtained from the isolated fungi displayed percentages of identity of 99% after performing a BLAST in NCBI for the genera *Diaporthe* and *Lasiodiplodia*. Based on the phylogenetic analysis of the ITS region, the phylogenetic relation of the isolates with sequences deposited in the GenBank data base was determined, resulting in the identification of *Diaporthe* sp. from the fungus isolated from cuajinicuil, and *Lasiodiplodia* sp. for the fungus isolated from soursop (Figure 2). The nucleotidic sequences of both pathogens were deposited in the GenBank data base, where they were given an accession number (Table 1).

The species of *Diaporthe* (*Phomopsis*) can be phytopathogenic, endophytic or saprophytic, in a wide range of hosts and new species were recently reported in diverse regions (Sun *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2020). The fungus causes the rotting of roots and fruits, canker, leaf spots, dieback and wilting (Gomes *et al.*, 2013); in citrus fruits it causes melanosis, peduncle rot and gummosis (Guarnaccia and Crous, 2018; Mondal *et al.*, 2007). To date there are no reports of this fungus affecting cuajinicuil. *Diaporthe* may have been related to the tree as an epiphyte, and in certain weather conditions, the fungus started to behave as a pathogen. In a thorough revision of recent investigations, no reports were found on the presence of *Diaporthe* on cuajinicuil crops causing leaf symptoms. An important aspect of this genus is that, being endophytic, they can occasionally behave as opportunist pathogens of the plants. An example of this is *D. foeniculina*, which is endophytic and an opportunist pathogenic

Las secuencias de ADN obtenidas a partir de los hongos aislados presentaron porcentajes de identidad de 99% después de realizar un BLAST en NCBI para los géneros *Diaporthe* y *Lasiodiplodia*. Con base en el análisis filogenético de la región ITS se determinó la relación filogenética de los aislados con secuencias depositadas en la base de datos del GenBank, resultando en la identificación de *Diaporthe* sp. para el hongo aislado de cuajinicuil, y *Lasiodiplodia* sp. para el hongo aislado de guanábana (Figura 2). Las secuencias nucleotídicas de ambos patógenos fueron depositadas en la base de datos del GenBank donde se les asignó un número de acceso (Cuadro 1).

Las especies de *Diaporthe* (*Phomopsis*) pueden ser fitopatógenos, endófitos o saprofitos, en una amplia gama de hospedantes, además nuevas especies se reportan recientemente en diversas regiones (Sun *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2020). El hongo causa pudrición de raíces y frutos, cancro, manchas foliares, muerte descendente y marchitez (Gomes *et al.*, 2013), en cítricos causa melanosis, pudrición del pedúnculo y gomosis (Guarnaccia y Crous, 2018; Mondal *et al.*, 2007). Hasta la fecha no hay reportes de este hongo afectando cuajinicuil. *Diaporthe* pudo haber estado asociado al árbol como epífita, y ante ciertas condiciones climáticas, el hongo se empezó a comportar como patógeno. En revisión exhaustiva de investigaciones recientes, no se encontraron reportes de la presencia *Diaporthe* en el cultivo de cuajinicuil, causando síntomas foliares. Un aspecto interesante de este género es que, siendo endófitos, en ocasiones pueden comportarse como patógenos oportunistas de las plantas. Un ejemplo de ello es *D. foeniculina*, el cual es endófito y patógeno oportunista en diversas malezas, en plantas ornamentales y árboles frutales (Mondal *et al.*, 2007). Este hallazgo de este género en cuajinicuil representa un aporte importante para el manejo del hongo en el frutal, en las pequeñas comunidades rurales de Oaxaca, México.

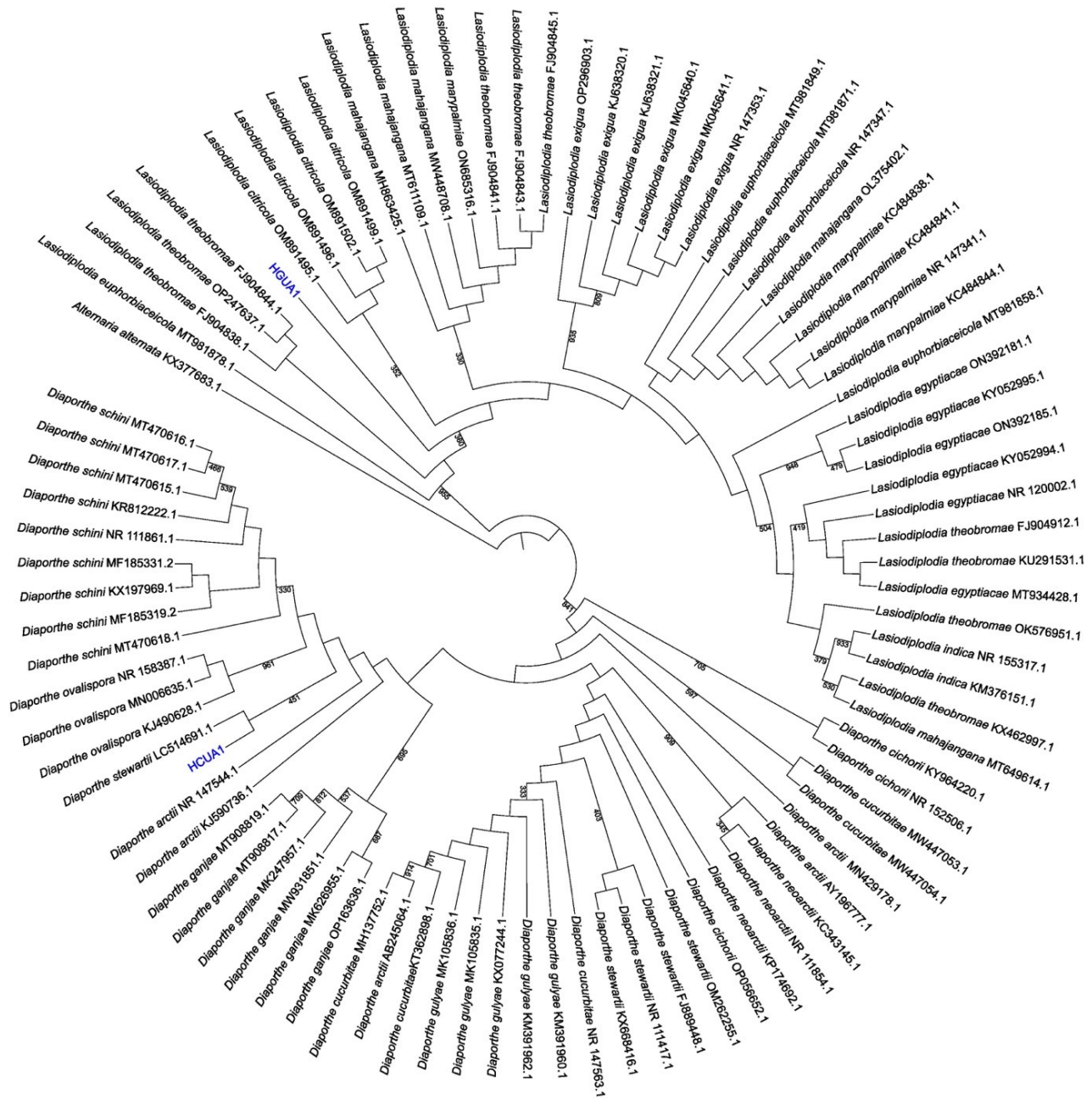


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree for the *Diaporthe* sp. fungus from cuajinicuil (HCUA1) and *Lasiodiplodia* sp. isolated from soursop (HGUA1). *Alternaria alternata* (KX377683.1) was used as an external group. The reliability in each node was evaluated using 1000 bootstrap replications. The isolations indicated in this study are marked blue.

Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de los hongos *Diaporthe* sp. recuperado de cuajinicuil (HCUA1) y *Lasiodiplodia* sp. aislado de guanábana (HGUA1). *Alternaria alternata* (KX377683.1) se utilizó como grupo externo. La confiabilidad en cada nodo se evaluó mediante 1000 réplicas de bootstrap. Los aislados indicados en este estudio están marcados en azul.

in several weeds, ornamental plants and fruit trees (Mondal *et al.*, 2007). This finding in cuajinicuil genus represents an important contribution for the management of the fungus in fruit trees in small rural communities of Oaxaca, Mexico.

Some of the symptoms caused by diverse *Lasiodiplodia* species have been reported to be canker, gummosis, dieback, leaf blight and crown damage in several crops (Shahbaz *et al.*, 2009). Many pathogens have a latent stage in their life cycle and cause no symptoms in their hosts. Salvatore *et al.* (2020) mention that the duration of the latent stage is highly variable, and the pathogenic change may depend on changes in the susceptibility of the host (some kind of stress), that may unleash a more aggressive behavior in the pathogen. The members of Botryosphaeriaceae are known to be latent pathogens of many hosts (Sakalidis *et al.*, 2011; Slippers *et al.*, 2007). In addition, a characteristic of *Lasiodiplodia* spp. is that it easily adapts to tropical and subtropical areas (Mehl *et al.*, 2017), such as the microclimates of Oaxaca; the increase in temperature can even generate the expansion of the range of hosts.

Lasiodiplodia theobromae has been reported to affect crops such as limes (Valle-De la Paz *et al.*, 2019), cacao, avocado, banana, peach (Picos-Muñoz *et al.*, 2015) and others. In the particular case of soursop, *L. theobromae* was identified as the causal agent of the rotting of fruits in Nayarit, Mexico by Cambero-Ayón *et al.* (2019), and in Mauritius island by Lutchmeah (1988), although these authors did not perform their studies on leaves. The morphological characteristics of *Lasiodiplodia*, isolated in this study coincide with those for the species *L. theobromae*, although morphologic (culture and conidial characteristics) and molecular studies are required, with the use of more genetic markers (26S rRNA, calmodulin and β -tubulin) to identify them at the level of species.

Se ha reportado que algunos de los síntomas causados por diversas especies de *Lasiodiplodia* son cancro, gomosis, muerte regresiva, tizón foliar y daño en la corona en diversos cultivos (Shahbaz *et al.*, 2009). Muchos patógenos tienen una etapa latente en su ciclo de vida y no causan síntomas en su hospedante. Salvatore *et al.* (2020) mencionan que la duración de la etapa latente es muy variable, y el cambio patogénico puede depender de cambios en la susceptibilidad del hospedante (algún tipo de estrés), que pueden desencadenar un comportamiento más agresivo en el patógeno. Es conocido que los miembros de Botryosphaeriaceae son patógenos latentes de muchos hospedantes (Sakalidis *et al.*, 2011; Slippers *et al.*, 2007). Además, una característica de *Lasiodiplodia* spp. es que se adapta fácilmente en regiones tropicales y subtropicales (Mehl *et al.*, 2017) como los microclimas de Oaxaca; incluso, el aumento de la temperatura puede generar la expansión del rango de hospedantes.

Se ha reportado a *Lasiodiplodia theobromae* afectando cultivos como lima (Valle-De la Paz *et al.*, 2019), cacao, aguacate, plátano, durazno (Picos-Muñoz *et al.*, 2015) entre otros. En el caso particular de guanábana, *L. theobromae* se identificó como agente causal de pudriciones en fruto en Nayarit, México por Cambero-Ayón *et al.* (2019), y en la Isla Mauricio por Lutchmeah (1988), aunque estos autores no realizaron estudios en follaje. Las características morfológicas de *Lasiodiplodia* aislado en este estudio coinciden con las de la especie *L. theobromae*, sin embargo, se requiere analizar morfológica (características de colonia y conidios) y molecularmente, con el uso de más marcadores genéticos (26S ARNr, calmodulina y β -tubulina) para lograr su identificación a nivel de especie.

Este estudio representa un primer acercamiento a los hongos que afectan el follaje de árboles de guanábana y cuajinicuil. La identificación de los organismos causales de una enfermedad

This study is the first approach to fungi that affect the leaves of soursop and cuajinicuil trees. The identification of the causal organisms of a disease initially helps design its integrated management. Both diseases are causing a severity of 50% in each crop. The scattering and emergence of phytopathogens in new regions in which there were no reports of its presence is a commitment to explore them, and after identifying them, establishing phytosanitary control plans to contribute to the integrated management of the crop. This work is a baseline to carry out more profound studies of fungi that limit the production of food in small communities in the country. It is therefore important to broaden the sampling to other fields of the same region, as well as the microscopic revision of more fungal isolations, whose genes that codify for the elongation factor 1- α (TEF 1- α) and β -Tubulin (β -Tub) will be analyzed.

According to Koch's postulates and the molecular identification, *Diaporthe* sp. was associated as a leaf pathogen for cuajinicuil in Peña Negra, San Sebastián Nopalera, Oaxaca. On the other hand, leaf symptoms in soursop were identified as having been caused by *Lasiodiplodia* sp. in the same location of Oaxaca, where these are backyard crops.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Valley of Etna Institute of Technology and the School of Chemical Science of the Autonomous University of Chihuahua for the support and the permits granted to complete a research stay. To the Secretariat of Public Education-Higher Learning Vice Principal's Office for the postdoctoral PRODEP scholarship (agreement OF-19-13180) granted to R.G.-E. To the community of Peña Negra, San Sebastián Nopalera for the permits granted to carry out this study.

permite inicialmente el diseño del manejo integrado de ésta. Ambas enfermedades están causando una severidad del 50% en cada cultivo. La dispersión y emergencia de fitopatógenos en nuevas regiones en las que no se tenía reporte de su presencia, representa un compromiso para explorarlos y a partir de su identificación, establecer planes de control fitosanitario que contribuyan al manejo integrado del cultivo. Este trabajo representa una línea base para realizar estudios más profundos de los hongos que limitan la producción de alimentos en pequeñas comunidades del país. Por lo que es importante ampliar el muestreo a otras parcelas de la misma región, así como la revisión microscópica de más aislados fúngicos, a los cuales se les realizará el análisis de los genes que codifican para el factor de elongación 1- α (TEF 1- α) y β -Tubulina (β -Tub).

De acuerdo con los postulados de Koch y a la identificación molecular, *Diaporthe* sp. se asoció como patógeno foliar de cuajinicuil en la localidad de Peña Negra, San Sebastián Nopalera, Oaxaca. Por otra parte, en síntomas foliares en guanábana se identificó *Lasiodiplodia* sp. en la misma localidad de Oaxaca, donde estos cultivos son de traspatio.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico del Valle de Etna y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua por el apoyo y los permisos otorgados para realizar una estancia de investigación. A la Secretaría de Educación Pública-Subdirección de Enseñanza Superior por la beca posdoctoral PRODEP (convenio OF-19-13180) otorgada a R.G.-E. A la comunidad de Peña Negra, San Sebastián Nopalera por los permisos otorgados para llevar a cabo este estudio.

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

## LITERATURE CITED

- Cambero-Ayón C, Luna-Esquivel G, Rios-Velasco C, Díaz-Heredia M, Rodríguez-Palomera M, Betancourt-Aranguré A and Cambero-Campos O. 2019. Causal agents of rot in soursop fruit (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 6:1-13. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e538>
- Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ and Crous PW. 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 31(1):1-41. <https://doi.org/10.3767/003158513X666844>
- Guarnaccia V and Crous PW. 2018. Species of *Diaporthe* on Camellia and Citrus in the Azores Islands. *Phytopathologia Mediterranea* [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-23254](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-23254)
- Guo YS, Crous PW, Bai Q, Fu M, Yang MM, Wang XH, Du YM, Hong N, Xu WX and Wang GP. 2020. High diversity of *Diaporthe* species associated with pear shoot canker in China. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 45(1):132-162. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.45.05>
- Lutchmeah RS. 1988. *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of *Annona muricata* in Mauritius. *Plant Pathology* 37:152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1988.tb02208.x>
- Mehl J, Wingfield MJ, Roux J and Slippers B. 2017. Invasive everywhere? Phylogeographic analysis of the globally distributed tree pathogen *Lasiodiplodia theobromae*. *Forests* 8(5): 145. <https://doi.org/10.3390/f8050145>
- Mondal SN, Vincent A, Reis RF and Timmer LW. 2007. Saprophytic colonization of citrus twigs by *Diaporthe citri* and factors affecting pycnidial production and conidial survival. *Plant Disease* 91:387-392. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-4-0387>
- Picos-Muñoz PA, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A and Allende-Molar R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:54-74. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100054](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054)
- Sakalidis ML, Hardy GESJ and Burgess TI. 2011. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: A focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecology* 4:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.06.001>
- Salvatore MM, Andolfi A and Nicoletti R. 2020. The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture* 10(10):488. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100488>
- Shahbaz M, Iqbal Z, Sallem A and Anjum MA. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). *Pakistan Journal of Botany* 41:359-368. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41\(1\)/PJB41\(1\)359.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41(1)/PJB41(1)359.pdf)
- Slippers B and Wingfield MJ. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21:90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Sun W, Huang S, Xia J, Zhang X and Li Z. 2021. Morphological and molecular identification of *Diaporthe* species in south-western China, with description of eight new species. *MycKeys* 77:65-95. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.77.59852>
- Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Perales-Rosas D, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández E, Hernández-Arenas M, Ariza-Flores R and Gijón-Hernández AR. 2019. Distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa en Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37:464-478. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-7>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In*: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ (Eds): *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego (USA)