

Morpho-molecular identification of the causal agent of avocado scab in Michoacán

Identificación morfo-molecular del agente causal de la roña del aguacate en Michoacán

José Luciano Morales-García*, Claudia Isabel López-Cornejo, Martha Elena Pedraza-Santos, Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas, Edna Esquivel-Miguel, Facultad de Agrobiología Presidente “Juárez”, U.M.S.N.H. P.º Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Uruapan, Michoacán, México, C. P. 60170; Soledad García-Morales, Unidad de Biotecnología Vegetal, CONACYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, Zapopan, Jalisco. CP 45019, México; Samuel Pineda-Guillermo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, IIAF. Carretera Morelia Zinapécuaro Kilómetro 9.5, Tarímbaro, Michoacán, México, C. P. 58880.

*Corresponding autor: jose.morales@umich.mx

Received: February 10, 2023.

Accepted: April 26, 2023.

Morales García JL, López-Cornejo CI, Pedraza-Santos ME, Chávez-Bárceñas AT, Esquivel-Miguel E, García-Morales S and Pineda-Guillermo S. 2023. Morpho-molecular identification of the causal agent of avocado scab in Michoacán. Mexican Journal of Phytopathology 41(2): 182-202.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2302-4>

First DOI publication: April 29, 2023.

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2023.

Abstract. Mexico is the main producer and exporter of avocado (*Persea americana*) in the world; however, pests and diseases are limiting factors for production. One of the diseases of great economic importance is avocado scab, which is characterized by causing corky-looking lesions on the epicarp of the fruits, which decreases quality

Resumen. México es el principal productor y exportador de aguacate (*Persea americana*) en el mundo; sin embargo, las plagas y enfermedades son factores limitantes para la producción. Una de las enfermedades de gran importancia económica es la roña del aguacate, la cual se caracteriza por provocar lesiones de apariencia corchosa en el epicarpio de los frutos, lo que disminuye la calidad y precio hasta en un 60%. En este estudio, se realizó un muestreo dirigido a frutos de aguacate con daño en el epicarpio de aspecto corchoso, estos comúnmente conocidos en campo como “roña” y “mancha púrpura”. Para la identificación molecular y filogenética se utilizó una combinación de técnicas con claves morfológicas y marcadores moleculares (ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, FE-1 α /EF-1 α , Sph1 F/Sph1R). También se realizaron pruebas de patogenicidad en frutos de plantas criollas y de las variedades Hass, Flor de María y Méndez. Mediante el

and price by up to 60%. In this study, a sampling was carried out aimed at avocado fruits with damage in the epicarp with a corky appearance, these commonly known in the field as “scab” and “purple spot”. For molecular and phylogenetic identification, a combination of techniques with morphological keys and molecular markers (ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, FE-1 α /EF-1 α , Sph1 F/Sph1R) was used. Pathogenicity tests were also carried out on fruits in plants of Hass, Flor de María and Méndez varieties. Through morphological analysis, fungi of the genera *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* and *Elsinoe* were identified. Molecular identification and phylogenetic analysis confirmed the presence of the species *Colletotrichum gloeosporioides* and *Elsinoe perseae*. *C. gloeosporioides* reproduced symptoms similar to the avocado scab disease. With the strain identified as *E. perseae*, the symptom known in the field as purple spot was confirmed, while *Pestalotiopsis* sp. caused descending necrosis.

Keywords: *Persea americana*, *Elsinoe perseae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, purple spot.

Avocado (*Persea americana*) has an enormous economic importance in Mexico due to the income it produces, making it one of the main agricultural products for export (SIAP, 2022); however, pests and diseases cause important losses in this crop (Urrea and Cardona, 2020). One of the diseases that affects fruit quality is avocado scab, which damages the epicarp of the avocado fruits and manifests itself as corklike lesions (Everett *et al.*, 2011). The layers of corklike tissue are formed as histological defense structures for plants when attacked by a pathogen (Cruz *et al.*, 2006).

Elsinoe perseae is the fungus that, since 1934, has been related to the symptomatology caused by avocado scab disease (Everett *et al.*, 2011;

análisis morfológico se identificaron a los hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* y *Elsinoe*. Con la identificación molecular y el análisis filogenético se corroboró la presencia de las especies *Colletotrichum gloeosporioides* y *Elsinoe perseae*. *Colletotrichum gloeosporioides* reprodujo síntomas similares al de la enfermedad roña del aguacate. Con la cepa identificada como *E. perseae* se corroboró el síntoma conocido en campo como “mancha púrpura”, mientras que *Pestalotiopsis* sp. provocó una necrosis descendente.

Palabras clave: *Persea americana*, *Elsinoe perseae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, mancha púrpura.

El aguacate (*Persea americana*) es de gran importancia en la economía de México por la captación de divisas, siendo uno de los principales productos agrícolas de exportación (SIAP, 2022); sin embargo, las plagas y enfermedades causan pérdidas importantes en este cultivo (Urrea y Cardona, 2020). Una de las enfermedades que afecta la calidad del fruto es la denominada roña del aguacate, que provoca daños en el epicarpio de los frutos de aguacate manifestándose con lesiones de apariencia corchosa (Everett *et al.*, 2011). Las capas de tejido de apariencia corchosa se forman como estructuras histológicas de defensa de las plantas al ser atacadas por un patógeno (Cruz *et al.*, 2006).

Elsinoe perseae es el hongo que desde 1934 se ha relacionado con la sintomatología causada por la enfermedad roña del aguacate (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017); sin embargo, existe una confusión de los daños que provoca este patógeno con los ocasionados por otros factores bióticos (ejemplo; alta incidencia de trips y ácaros) y abióticos (ejemplo; daños mecánicos, daños por rozadura de viento etc.) (SENASICA, 2018).

Fan *et al.*, 2017); however, there is a confusion regarding the damages caused by this pathogen and those caused by other biotic factors such as a high incidence of thrips and mites, and abiotic factors such as mechanical damages, damages caused by wind, etc. (SENASICA, 2018).

Jenkins reported that avocado scab is caused by *E. perseae* and described the symptoms as dark, round or irregular spotty lesions than, when they join, can cover the avocado fruit partially or entirely, giving it a brown, corklike aspect (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017). On the other hand, Morales (2017) described a similar symptom which he called purple spot, or purple spot, which displays round, initially purple lesions that become darker as they grow, and when the coalesce, look like scabs. However, other authors, such as Djeugap *et al.* (2015), Martínez-Hernández *et al.* (2017) and Becerra and Morales (2019), did not associate *E. perseae* to the symptom of the avocado scab, and rather related other pathogens such as *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp. and *Curvularia* sp.

Due to this confusion, the aim of this study was to morphologically and molecularly identify the pathogens related to the avocado scab symptom, taking samples of fruits with a corklike aspect that are commonly known in the field as “typical scab” and “purple spot”. Pathogenicity tests were also carried out to reveal the causal agent of this disease.

MATERIALS AND METHODS

Gathering sites. Avocado fruits with symptoms of corklike aspects, which are commonly known in the field as “typical scab” and “purple spot”, were gathered from different orchard in Michoacán (Figure 1). After gathering, the fruits were placed in brown paper bags (26 x 12.5 x 6.5 cm) to avoid humidity and the development of saprophytic fungi.

Jenkins reportó que la roña del aguacate es causada por *E. perseae* y describió la sintomatología como lesiones de manchas oscuras redondas o irregulares que, al unirse, pueden cubrir parcial o totalmente al fruto de aguacate, dando un aspecto corchoso de color café (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017). Por su parte Morales (2017) describió un síntoma similar al cual denominó mancha púrpura en el cual se presentan lesiones redondas iniciales de color púrpura que, al crecer, adquieren una coloración más oscura y que al coalescer dan el aspecto de roña. Sin embargo, otros autores, como Djeugap *et al.* (2015), Martínez-Hernández *et al.* (2017) y Becerra y Morales (2019), no asociaron a *E. perseae* al síntoma de la roña del aguacate, relacionando a otros patógenos como *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp. y *Curvularia* sp.

Debido a esta confusión, el objetivo de este estudio fue identificar morfológica y molecularmente a los patógenos relacionados con el síntoma de la roña del aguacate, realizando muestreos dirigidos a los frutos de aspecto corchoso que comúnmente en campo son conocidos como “roña típica” y “mancha púrpura”. También se realizaron pruebas de patogenicidad para esclarecer al agente causal de esta enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de colecta. Se colectaron en diferentes huertos de Michoacán frutos de aguacate con síntomas de aspecto corchoso que en campo son conocidos comúnmente como “roña típica” y “mancha púrpura” (Figura 1). Después de la colecta, los frutos se colocaron en bolsas de papel estraza (26 x 12.5 x 6.5 cm) para evitar la humedad y el desarrollo de hongos saprofitos.



Figure 1. Avocado fruits with symptoms known in the field as typical scab (A) and purple spot (B).
Figura 1. Frutos de aguacate con síntomas conocidos en campo como roña típica (A) y mancha púrpura (B).

To gather the avocado fruits, the agroecological areas were divided according to altitude (meters above sea level, or m.a.s.l.) in which, according to Anguiano *et al.* (2007) three types of climates stand out for the favorable development of this crop and to express its greatest productive potential: humid (1,600 to 1,800 m.a.s.l.), semi-warm subhumid (1,200 to 1,600 m.a.s.l.) and temperate subhumid (1,900 to 2,300 m.a.s.l.) (Table 1).

Isolation of the fungi. The avocado fruits gathered from the field were washed with tap water and later rinsed with distilled water to eliminate pollutants. Fresh lesions were taken from the epicarp of the fruit in 5×5 mm fragments. For the disinfection of fruits, the method proposed by Zhi Li *et al.* (2008) was used, with slight modifications. The fragments of the epicarp of avocado fruits were placed in a 6% sodium hypochlorite solution for 90 s, then rinsed with sterile distilled water. They were then washed for a second time with 70% ethanol for 60 s, and

Para la colecta de los frutos de aguacate, las áreas agroecológicas se dividieron de acuerdo con la altitud (metros sobre el nivel del mar; m.s.n.m.) que, según Anguiano *et al.* (2007) destacan tres tipos de climas para el desarrollo favorable de este cultivo y expresar su máximo potencial productivo: húmedo (entre 1,600 y 1,800 m.s.n.m.), semicálido subhúmedo (entre 1,200 y 1,600 m.s.n.m.) y templado subhúmedo (entre 1,900 y 2,300 m.s.n.m.) (Cuadro 1).

Aislamiento de los hongos. Los frutos de aguacate colectados en campo se lavaron con agua corriente y posteriormente se enjuagaron en agua destilada para eliminar contaminantes. Se tomaron lesiones frescas del epicarpio del fruto en fragmentos de 5×5 mm. Para la desinfección de los frutos, se utilizó la metodología propuesta por Zhi Li *et al.* (2008), con algunas modificaciones. Los fragmentos del epicarpio de los frutos de aguacate se colocaron en hipoclorito de sodio al 6% durante 90 s, seguido de

**Table 1. Gathering sites of avocado fruit with symptoms of “typical scab” and “purple spot”.
 Cuadro 1. Sitios de colecta de frutos de aguacate con síntomas de “roña típica” y “mancha púrpura”.**

Áreas agroecológicas (m.s.n.m.)	Sitios de colecta	Coordenadas	Altura m.s.n.m
Semicálido subhúmedo (1,200 y 1,600)	Cerro colorado	19°31'69"N, 100°46'58"O	1,243
	Ordeñitas	19°23'50"N, 102°18'94"O	1,060
	Patuan	19°39'16"N, 101°91'50"O	1,260
	Zumpimito	19°37'29"N, 100°55'4"O	1,600
	Ziracuaretiro	19°43'57"N, 101°92'93"O	1,380
	Taretan	19°33'38"N, 101°918'33"O	1,130
	Mesa de Cazares	19°37'75"N, 101°85'39"O	1,560
	San Ángel Zurumucapio	19°44'77"N, 101°88'86"O	1,600
	Pareo	19°33'13"N, 102°45'08"O	1,430
	Jicalan	19°38'33"N, 102°07'61"O	1,600
Húmedo (entre 1,600 y 1,800)	Zacandaro	19°35'94"N, 102°18'58"O	1,700
	Cutzato	19°36'63"N, 102°13'47"O	1,700
	Toreo el alto	19°46'00"N, 102°00'30"O	1,800
	La Basilia	19°46'25"N, 102°06'50"O	1,860
	San Andrés Coru	19°46'75"N, 101°94'50"O	1,700
	San Juan Nuevo	19°41'66"N, 102°12'86"O	1,880
Templado subhúmedo (entre 1,900 y 2,300)	Ario de Rosales	19°20'72" N, 101°70'80"O	1,910
	Canacuas	19°64'38" N, 102°04'83"O	2,200
	Tingambato	19°50'19" N, 101°85'25"O	1,980
	Zirahuen	19°54'167"N, 101°73'19"O	2,090
	Tancitaro	19°33'75"N, 102°36'30"O	2,080
	El Durazno	19°08'25"N, 101°66'00"O	1,900
	Lagunillas	19°56'25"N, 101°41'58"O	2,100
	Cheran	19°68'66"N, 101°95'47"O	2,380
Salvador Escalante	19°40'64"N, 101°64'00"O	2,239	

rinsed for the last time with sterile distilled water. The tissue was placed in sterilized paper towels to absorb humidity. Once the fragments of the plant material were disinfected, they were planted equidistantly in Petri dishes with a PDA culture medium, then the dishes were sealed with parafilm, incubated at 28 °C with a humidity of 80% for 72 h. After this time, the Petri dishes were inspected for fungal growth.

Morphological identification. To identify the fungal isolations, the taxonomical keys by Barnett and Hunter (2006) were used. To identify *E.*

un enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente, se realizó un segundo lavado con etanol al 70% durante 60 s y un último enjuague con agua destilada estéril. El tejido se colocó en toallas de papel esterilizadas para absorber la humedad. Una vez que los fragmentos del material vegetal se desinfectaron, se realizó la siembra en cajas Petri con medio de cultivo PDA, de manera equidistante, las cajas se sellaron con parafilm, se incubaron a 28 °C, con 80% de humedad, durante 72 h. Después de este tiempo, las cajas Petri se revisaron para observar el crecimiento de los hongos.

perseeae, the strain ATCC 11190 of this species was taken as a reference, which is found in the microbial collection in Miami, Florida, U.S.A. and which was provided by the Technology and Design Research and Assistance Center for the State of Jalisco (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. - CIATEJ), Zapopan, Jalisco, Mexico.

Molecular identification. The purified isolations taken from the fungus were taken to the CIATEJ for the extraction of DNA by breaking the cell wall and membrane. The buffer solution was CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) to promote cell lysis. Chloroform-isoamyl alcohol was used (in a 24:1 ratio) as an organic solvent and centrifuged at 5,000 rpm for 10 min to promote the denaturation and separation of proteins. The DNA was then precipitated and its quality was verified by electrophoresis in a 1.0% agarose gel.

The concentration of the genomic DNA was quantified with a Nanodrop and it was adjusted to 20 ng mL⁻¹. DNA amplification was carried out with a PCR, using primers ITS-5/ITS-4, ITS1/ITS4, EF-1 α F/ EF-1 α R and Sph1F/Sph1R. The amplifications of the PCR products were verified by electrophoresis with a 5 μ L gel sample in a 1.5% agarose gel. The PCR products were purified following the instructions by the manufacturer (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega[®]). The amplified fragments were sent to the Macrogen lab (Seoul, South Korea) for sequencing.

The bidirectional sequences were aligned with the Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) and MAFFT v.7.475 (Katoh y Standley, 2013) programs, they were verified in BioEdit (Hall, 1999) in order to obtain a consensus sequence and the sequence obtained was assembled and compared with those available in the National

Identificación morfológica. Para la identificación de los aislamientos de los hongos se utilizaron las claves de Barnett y Hunter (2006). Para identificar a *E. perseeae* se tomó como referencia la cepa ATCC 11190 de esta especie, la cual se encuentra depositada en el cepario de Miami, Florida, EUA y que fue facilitada por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Zapopan, Jalisco, México.

Identificación molecular. Los aislamientos purificados del hongo se trasladaron al CIATEJ para la extracción de ADN mediante la ruptura de la pared y membrana celular. La solución amortiguadora fue CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) para favorecer la lisis celular. Se utilizó cloroformo-alcohol isoamílico (en proporción 24:1) como disolvente orgánico y se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min para favorecer la desnaturalización y separación de proteínas. Se procedió con la precipitación del ADN y se verificó su calidad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 %.

La concentración del ADN genómico se cuantificó con un Nanodrop y se ajustó a 20 ng mL⁻¹. La amplificación del ADN se realizó mediante PCR, usando los iniciadores ITS-5/ITS-4, ITS1/ITS4, EF-1 α F/ EF-1 α R y Sph1F/Sph1R. Las amplificaciones de los productos de la PCR se verificaron por electroforesis con 5 μ L de muestra en un gel de agarosa al 1.5 %. La purificación de los productos de PCR se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega[®]). Los fragmentos amplificados se enviaron al laboratorio de Macrogen (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación.

Las secuencias bidireccionales se alinearon con los programas Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) y MAFFT v.7.475 (Katoh y Standley, 2013), se corroboraron en BioEdit (Hall, 1999) con la finalidad de obtener una secuencia consenso y la

Center for Biotechnological Information (NCBI), using the BLAST tool for highly similar sequences. For the identification with BLASTn, the percentage of coverage and similarity was considered; values of $\geq 80\%$ of coverage and a range of 97 to 100% of similarity of the sequence was considered, that is, a divergence of up to 3% of the sequence to assign a species (Raja and Oberlies, 2017).

Phylogenetic analysis. A multilocus phylogenetic analysis was carried out for the isolations identified as *E. perseae*, using the sequences obtained with the primers ITS5/ITS4 or ITS1/ITS4, SPh1 F/SPh1 R (LSU) and EF-1 α F/ EF-1 α R. For this analysis, sequences from species of the genus *Elsinoe*, previously deposited in the GenBank® data base were used. In the case of the isolations obtained from “typical scab”, an analysis was carried out based on the sequencing of primers ITS4/ITS5.

Once the consensus sequences were obtained, they were compiled in a FASTA format. Later, the sequences were aligned using the MAFFT v.7.475 program (Kato and Standley, 2013). The sequences from LSU, EF-1 α and ITS, obtained from strains identified as *E. perseae* were linked in the MESQUITE v.3.6 program (Maddison and Maddison, 2016). The phylogenetic analysis was based on the Bayesian inference (BI) algorithm and previously, the evolutionary model was determined using the JModeltest 2.1.7 program (Nylander, 2004).

For the phylogenetic analysis of the strains identified as *Colletotrichum gloeosporioides*, the sequence obtained with primers ITS5/ITS4 was used, as well as sequences from homologous species and others belonging to the same genus obtained from the GenBank. For the location of the isolations, the program MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) was used, with a Jukes Cantor (JC) evolutionary model obtained in the program

secuencia obtenida se ensambló y comparó con las disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), usando la herramienta BLAST para secuencias altamente similares.

Para la identificación con BLASTn se consideró el porcentaje de cobertura y similitud, se consideraron valores $\geq 80\%$ de cobertura y un rango de 97 a 100 % de similitud de la secuencia. Es decir, hasta 3% de divergencia de la secuencia para asignar una especie (Raja y Oberlies, 2017).

Análisis filogenético. Se realizó un análisis filogenético multilocus para los aislamientos identificados como *E. perseae*, utilizando las secuencias obtenidas con los iniciadores ITS5/ITS4 o ITS1/ITS4, SPh1 F/SPh1 R (LSU) y EF-1 α F/ EF-1 α R. Para este análisis se utilizaron secuencias de especies del género *Elsinoe* ya depositadas en la base de datos del GenBank®. En el caso de los aislamientos obtenidos de “roña típica” se realizó un análisis basado en la secuenciación de los iniciadores ITS4/ITS5.

Una vez obtenidas las secuencias consenso, éstas se compilaron en formato FASTA. Después, las secuencias se alinearon con el programa MAFFT v.7.475 (Kato y Standley, 2013). Las secuencias de los genes LSU, EF-1 α e ITS obtenidas de las cepas identificadas como *E. perseae* se concatenaron en el programa MESQUITE v.3.6 (Maddison y Maddison, 2016). El análisis filogenético se basó en el algoritmo de inferencia bayesiana (BI) y previamente se determinó el modelo evolutivo en el programa JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004).

Para el análisis filogenético de las cepas identificadas como *Colletotrichum gloeosporioides* se utilizó la secuencia obtenida con los iniciadores ITS5/ITS4, así como secuencias de especies homólogas y otras pertenecientes al mismo género obtenidas del GenBank. Para la ubicación de los aislamien-

JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). Ten thousand generations were considered and samples were taken from trees every 1,000 repetitions. It was executed under the Markov Monte Carlo (MCMC) model and the analysis stopped once an average was obtained, along with the frequency partition standard deviation (se) between chains, below 0.01 (se = 0.0099). Twenty-two phylogenetic trees were obtained, out of which 18 were sampled, and 25% of the trees were discarded. The remaining phylogenetic trees were combined to calculate the posterior probability and obtain a consensus tree (Holder and Lewis, 2003). *C. boninense*, strain 126 was used as an external group to the species, since it belongs to another complex of the same genus.

A multilocus phylogenetic analysis was carried out for the species *E. perseae* in order to provide greater reliability and support to the identification of the isolations of this fungus. The sequences obtained in this investigation were considered, along with homologous sequences and those from other species of the same genus that cause similar damages to other plant species. The fungus *Myriangium hispanicum*, which belongs to the family Myringiaceae, was used as an external group. The sequences were obtained from the GenBank database, according to Fan *et al.* (2017). Once the sequences were obtained, a FASTA file was created. The sequences were aligned with the program MAFFT v.7.475 (Katoh and Standley, 2013) for each gene. The genes were linked with the program Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) and MESQUITE v.3.6 (Maddison and Maddison, 2016). The evolutionary model was obtained using the software JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). The phylogenetic analysis was carried out using the BI algorithm with the program MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012). A total of 575,000 generations were considered and tree samples were taken every 1,000 repetitions. It was

se utilizó el programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) con un modelo evolutivo Jukes Cantor (JC) obtenido en el programa JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). Se consideraron 10,000 generaciones y se tomaron muestras de árboles cada 1,000 repeticiones. Se ejecutó bajo el modelo Markov Monte Carlo (MCMC) y el análisis se detuvo una vez que se obtuvo un promedio y la desviación estándar (se) de partición de frecuencias entre cadenas, menor a 0.01 (se = 0.0099). Se obtuvieron 22 árboles filogenéticos de los cuales se muestrearon 18, se descartó el 25 % de los árboles. El resto de los árboles filogenéticos se combinaron para calcular la probabilidad posterior y obtener un árbol consenso (Holder y Lewis, 2003). Se utilizó como grupo externo a la especie *C. boninense*, cepa 126, perteneciente a otro complejo del mismo género.

Para la especie *E. perseae* se realizó un análisis filogenético multilocus para aportar mayor confiabilidad y soporte a la identificación de los aislados de este hongo. Se consideraron las secuencias obtenidas en esta investigación, las secuencias homólogas y de otras especies del mismo género que ocasionan daños similares en otras especies de plantas. Como grupo externo se utilizó al hongo *Myriangium hispanicum* que pertenece a la familia Myringiaceae. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del GenBank, según Fan *et al.* (2017). Una vez obtenidas las secuencias, se creó un archivo en formato FASTA. Las secuencias se alinearon con el programa MAFFT v.7.475 (Katoh y Standley, 2013) para cada gen. La concatenación de los genes se realizó con el programa Geneious prime v. 2021.0.3 (Kearse *et al.*, 2012) y MESQUITE v.3.6 (Maddison y Maddison, 2016). El modelo evolutivo se obtuvo con el software JModeltest 2.1.7 (Nylander, 2004). El análisis filogenético se realizó mediante el algoritmo de IB con el programa MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012). Se consideraron 575,000 generaciones y se tomaron muestras

executed under the MCMC model and the analysis stopped once an average and a standard deviation of frequency partition between chains below 0.01 ($de = 0.0097$) were obtained. A total of 1,152 phylogenetic trees were obtained, out of which 864 were sampled; 25% of the trees sampled were discarded. The rest of the trees were combined to calculate the posterior probability and obtain a consensus tree (Holder and Lewis, 2003).

Pathogenicity tests. In order to evaluate pathogenicity, 25 avocado plants from nurseries were used (creole, Hass, Flor de María, Méndez), approximately 18 months after being transplanted. The avocado fruits were inoculated when their size was 6-9 cm in length by 4-6 cm in width (stage of the filling of the fruit). The isolations selected for pathogenicity tests were those that had a higher percentage of growth of every symptom sampled. Leaves, branches and fruits from each plant of every variety were inoculated.

Two types of inoculation were carried out: direct and indirect. The former consisted in cutting a lesion in the epicarp of the fruit and in the young stems with a number 0 entomological pin. Mycelium discs were then placed (≈ 1 cm in diameter) in the isolated fungi on the lesion, and covered with cotton dampened with sterile distilled water and “kleen pack” plastic. The indirect method consisted of performing small lesions on the fruits and young branches, followed by the spraying of a suspension with conidia, spores and fragments of mycelia at a concentration of 1×10^6 propagules mL^{-1} , prepared following Gilchrist Saavedra *et al.* (2005). Finally, the plants were covered with a plastic bag, as if in a humid chamber, for three days. The incidence of the symptom was evaluated in the different varieties.

The inoculated fruits were observed weekly for three months to detect the presence of the symptoms. Next, the fungi were reisolated to verify the identity of the pathogen.

de árboles cada 1,000 repeticiones. Se ejecutó bajo el modelo MCMC y el análisis se detuvo una vez que se obtuvo un promedio y desviación estándar de partición de frecuencias entre cadenas menor a 0.01 ($de = 0.0097$). Se obtuvieron 1,152 árboles filogenéticos de los cuales se muestrearon 864, se descartó el 25 % de los árboles muestreados. El resto de los árboles se combinaron para calcular la probabilidad posterior y obtener un árbol consenso (Holder y Lewis, 2003).

Pruebas de patogenicidad. Para evaluar la patogenicidad, se utilizaron 25 plantas de aguacate (criollo, Hass, Flor de María, Méndez) de vivero de aproximadamente 18 meses de haber sido injertadas. Los frutos de aguacate se inocularon cuando tenían un tamaño de 6-9 cm de largo por 4-6 cm de ancho (etapa de llenado de fruto). Los aislamientos seleccionados para las pruebas de patogenicidad fueron las que tuvieron un porcentaje mayor de crecimiento de cada síntoma muestreado. Se inocularon hojas, ramas y frutos de cada planta de cada variedad.

Se realizaron dos tipos de inoculación: directa e indirecta. La primera consistió en realizar heridas en el epicarpio del fruto y en los tallos jóvenes con un alfiler entomológico del número 0. Posteriormente, se colocaron discos (≈ 1 cm de diámetro) de micelio de los hongos aislados sobre la herida, y se cubrió con algodón húmedo con agua destilada estéril y plástico “kleen pack”. En el método indirecto se realizaron pequeñas heridas a los frutos y a las ramas jóvenes, después se asperjó una suspensión con conidios, esporas y fragmentos de micelio a una concentración de 1×10^6 propágulos mL^{-1} que se preparó según Gilchrist Saavedra *et al.* (2005). Finalmente, las plantas se cubrieron con una bolsa de plástico a manera de cámara húmeda durante tres días. En las diferentes variedades se evaluó la incidencia del síntoma.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological identification. Out of the plant tissues planted with symptoms of “typical scab”, 16 different isolations were obtained, eight of which were identified as possible phytopathogenic fungi, which correspond to the genera *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* and *Epicoccum*. Out of these, the genus *Colletotrichum* was the most frequent (90%), followed by *Pestalotiopsis* (40%). The rest of the fungi did not surpass 3%. These data coincide with works by Djeugap *et al.* (2015), Alfaro *et al.* (2017) and Becerra (2019), who reported the presence of species of the genus *Colletotrichum* more frequently in isolations of the avocado scab symptom.

Based on the studies carried out by Hernández and González (2010) and Pérez *et al.* (2016), the remaining eight species were discarded due to their lower frequency of culture development (presence in a maximum of three dishes planted), as well as to the identification as pollutant fungi, for the case of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*.

In the morphological identification of the strain with the highest growth frequency, the development of white cultures with a gray center and a cottonlike texture was observed, with a production of orange conidial masses in the center. This culture was characterized for its rapid growth (it covered the 15 cm Petri dish in 8 days). In its microscopic characteristics, it displayed a septated mycelium, unicellular conidia elongated to the point of being almost cylindrical, with a slight narrowing in the center, giving it an appearance similar to a septum, and with rounded edges (Barnett and Hunter, 1998). These characteristics coincide with those described for the genus *Colletotrichum*, belonging to the phylum Ascomycota, class Hypocreomycetidae

Los frutos inoculados se observaron cada semana, durante tres meses para detectar la presencia de los síntomas. Después se realizaron reaislamientos de los hongos para corroborar la identidad del patógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica. De la siembra del tejido vegetal con síntoma de “roña típica” se obtuvieron 16 aislamientos diferentes, ocho se identificaron como posibles hongos fitopatógenos, los cuales corresponden a los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* y *Epicoccum*. De éstos, el género *Colletotrichum* fue el más frecuente observándose su crecimiento en el 90% de las cajas, seguido de *Pestalotiopsis* en 40% de estas y el resto de los hongos no superó el 3%. Estos datos concuerdan con los trabajos de Djeugap *et al.* (2015), Alfaro *et al.* (2017) y Becerra (2019), quienes reportaron la presencia de especies del género *Colletotrichum* con mayor frecuencia en aislamientos del síntoma de la roña del aguacate.

Con base en los estudios realizados por Hernández y González (2010) y Pérez *et al.* (2016), se descartaron las ocho especies restantes por su menor frecuencia de desarrollo de colonias (presencia en un máximo en tres cajas sembradas), así como por la identificación como hongos contaminantes para el caso de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*.

En la identificación morfológica de la cepa con mayor frecuencia de crecimiento, se observó el desarrollo de colonias blancas con el centro gris, de textura algodonosa, con producción de masas conidiales de color naranja en el centro. Se caracterizó por ser una colonia de rápido crecimiento (en ocho días cubrió la caja Petri de 15 cm de diámetro).

and order Glomerellales (Réblová *et al.*, 2011) (Figure 2).

The second isolation with the highest growth percentage, *Pestalotiopsis* sp., developed white septated mycelium cultures with a brush-shaped growth. In addition, the development of black fructiferous bodies that presented multicellular spindle-shaped conidia (3 to 5 cells) with three apical flagella and one basal one (Barnett and Hunter, 2006). These characteristics coincided with those described for the genus that belongs to the phylum Ascomycota, class Sordariomycetes and order Xylariales (Réblová *et al.*, 2011) (Figure 2).

En sus características microscópicas, se observó micelio septado, conidios unicelulares alargados, casi cilíndricos con un ligero estrechamiento en el centro que da la apariencia de un septo y con extremos redondeados (Barnett y Hunter, 1998). Estas características coinciden con las referidas para el género *Colletotrichum* perteneciente al Phylum Ascomycota, Clase Hypocreomycetidae y Orden Glomerellales (Réblová *et al.*, 2011) (Figura 2).

El segundo aislamiento con mayor porcentaje de crecimiento, *Pestalotiopsis* sp., desarrolló colonias blancas de micelio septado con un crecimiento rosetado. Además, se observó el desarrollo de

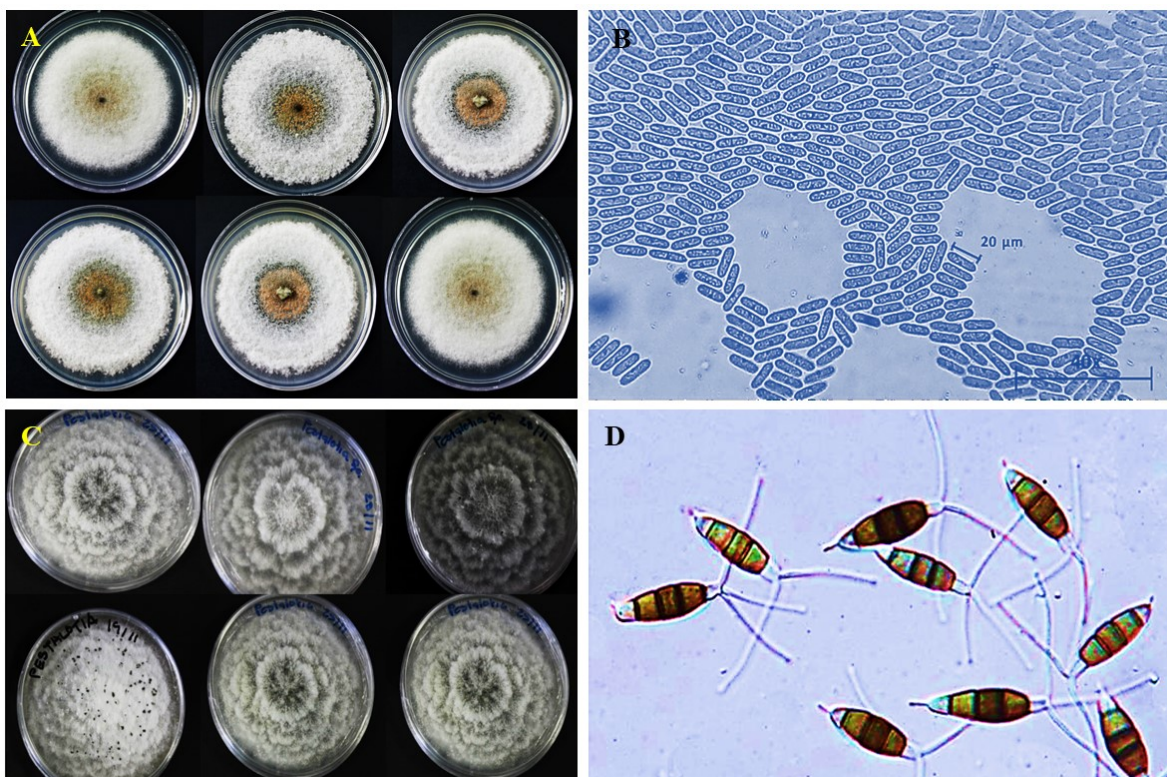


Figure 2. A) Isolations of the genus *Colletotrichum* sp. that show the cottonlike growth with a high content of formation of orange to pink waxy propagules in the center. B) Formation of hyaline, ovoidal or oblong conidia, with a shortened shape and an even, 25- 30 µm, circular ending. C) *Pestalotiopsis* sp. cultures and a development of bright black and irregularly shaped cirrus. d) Conidia with septa and three flagella.

Figura 2. A) Aislamientos del género *Colletotrichum* sp. que muestran el crecimiento algodonoso con alto contenido de formación en el centro de propágulos cerosos de color naranja a rosado. B) Formación de conidios hialinos, ovoides u oblongos de forma acortada con terminación circular uniforme de 25- 30 µm. C) Colonias de *Pestalotiopsis* sp. y desarrollo de cirrus color negro brillante y de forma irregular. d) Conidios con septos y tres flagelos.

“Purple spot” symptom. In the plant tissue with symptoms of “purple spot”, the cultures that were obtained most frequently were those that grew in viscous and cerebriform stroma, with a slow growth of 0.35 mm per day, elevations in the center, a great variability of shapes and light orange and light yellow colors, which became darker with age, turning reddish browns, some of which were plushy-looking, with aerial mycelia and humid in the center, with micro and macro conidia from 3 to 14 microns and tuberculate mycelium; these were identified morphologically as *Elsinoe* sp., since these characteristics coincide with those presented by Hyde *et al.* (2013) as characteristics of the genus *Elsinoe*. *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. were also identified with occasional growth (1-2%) (Figure 3).

cuerpos fructíferos de color negro que presentaron conidios multicelulares fusiformes (de 3 a 5 células) con tres flagelos apicales y uno basal (Barnett y Hunter, 2006). Estas características coincidieron con las referidas para este género que pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes y Orden Xylariales (Réblová *et al.*, 2011) (Figura 2).

Síntoma de “mancha púrpura.” Del tejido vegetal con síntoma de “mancha púrpura”, se obtuvieron 25 aislamientos, en los cuales las colonias con mayor frecuencia fueron las de crecimiento en estroma tipo viscoso y cerebriforme, lento crecimiento de 0.35 mm por día, con elevaciones en el centro, con gran variabilidad de formas y colores naranjas claro, amarillo claro, que con la edad se oscurecieron tornándose rojos cafés rojizos, algunas de

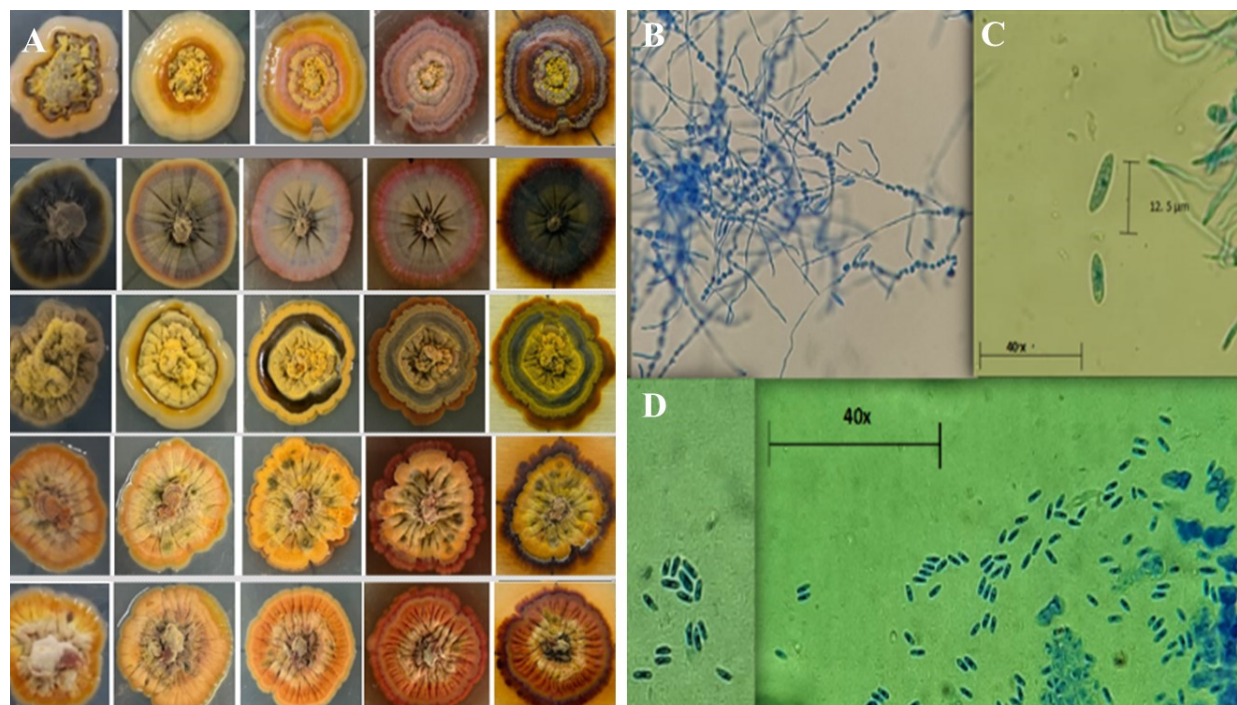


Figure 3. A) Variability in color and shape of the growth of *E. perseae* isolations. B) tuberculate mycelium. C) and D) conidia measuring 3-14 micrometers.

Figura 3. A) Variabilidad en color y forma de crecimiento de los aislados de *E. perseae*. B) micelio turuloso. C) y D) conidios de 3-14 micrometros.

Molecular identification. With the amplification of primers ITS5/ITS4, *C. gloeosporioides* was identified; however, for *Pestalotiopsis* sp., the sequencing results were not conclusive (Table 2). On the other hand, the sequencing of genes LSU, EF-1 α and ITS helped identify *E. perseae* (Table 3). The nucleotide sequences identified were deposited in the GenBank data base (Table 4).

apariciencia afelpada, micelio aéreo y humedad en el centro, con presencia de micro y macro conidios que fueron de los 3-14 micras y micelio turuloso, estas fueron identificadas morfológicamente como *Elsinoe* sp., ya que estas características concuerdan con lo expuesto por Hyde *et al.* (2013), como características del género *Elsinoe*. También se identificó con crecimientos esporádicos (1-2%) a *Colletotrichum* sp. y *Alternaria* sp. (Figura 3).

Table 2. Molecular identification of the strains isolated from the symptom of “typical scab” by the amplification of primers ITS5/ITS4.

Cuadro 2. Identificación molecular de las cepas aisladas del síntoma de “roña típica” mediante la amplificación de los iniciadores ITS5/ITS4.

Aislamiento	Identificación morfológica	Secuencia homóloga del Gene Bank	Especie	Identidad (%)
C7	<i>Colletotrichum</i> sp.	MK758005.1	<i>C. gloeosporioides</i>	100
C9	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	N/A	N/A	N/A

Table 3. Molecular identification of the fungus isolated from the symptom of “purple spot” by sequencing the genes LSU, EF-1 α and ITS.

Cuadro 3. Identificación molecular del hongo aislado del síntoma de “mancha púrpura” mediante la secuencia de los genes LSU, EF-1 α e ITS.

Aislamiento	Identificación morfológica	Secuencia homóloga del GenBank®	Especie	Identidad (%)
ITS				
C1	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	N/A	N/A
C4	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	<i>E. perseae</i>	99.69
H3	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	<i>E. perseae</i>	99.67
H4	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	<i>E. perseae</i>	99.51
H6	<i>E. perseae</i>	MH855586.1	<i>E. perseae</i>	97.46
EF-1 α				
C1	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	100
C4	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	99.71
H3	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	100
H4	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	100
H6	<i>E. perseae</i>	KX886902.1	<i>E. perseae</i>	100
LSU				
C1	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.72
C4	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.86
H3	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.17
H4	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.72
H6	<i>E. perseae</i>	NG_063977.1	<i>E. perseae</i>	99.86

Table 4. Sequences selected for the phylogenetic analysis of *E. perseae*.
Cuadro 4. Secuencias seleccionadas para el análisis filogenético de *E. perseae*.

Especie	Código del aislamiento	Número de acceso al Genbank		
		ITS	LSU	EF-1 α
<i>C. gloeosporioides</i>	C7	MZ314618		
<i>E. perseae</i>	C1	N/A	MZ310447	MZ319391
<i>E. perseae</i>	C4	MZ310437	MZ310448	MZ319392
<i>E. perseae</i>	H3	MZ310438	MZ310449	MZ319393
<i>E. perseae</i>	H4	MZ310439	MZ310450	MZ319394
<i>E. perseae</i>	H6	MZ310440	MZ310451	MZ319395

Phylogenetic analysis of the isolations obtained from avocado fruits with symptoms of “typical scab”. The phylogenetic tree grouped six clades, along with the external group, out of which two group the entire species of *C. gloeosporioides*, in which the strain identified in this study is found. This verifies the identity of the isolations obtained in this study as *C. gloeosporioides* (Figure 4).

Phylogenetic analysis of the strains isolated from avocado fruits with symptoms of “purple spot”. The Bayesian phylogenetic tree grouped more than 14 clades, along with the external group. The sequences obtained from the strains morphologically identified as *E. perseae* were grouped with the strains deposited in the GenBank with the same species, which corroborates the identity of the strains isolated from the “purple spot symptom” as *E. perseae* and it supports the monophyletic origin of this species (Figure 5).

Pathogenicity tests. It was inoculated with *Pestalotiopsis* sp. and *C. gloeosporioides* to evaluate the “typical scab” symptom; and with an isolation identified as *E. perseae* to evaluate the “purple spot” symptom.

Identificación molecular. Mediante la amplificación de los iniciadores ITS5/ITS4 se identificó a *C. gloeosporioides*; sin embargo, para *Pestalotiopsis* sp. los resultados de la secuenciación no fueron concluyentes (Cuadro 2). Por otro lado, mediante la secuencia de los genes LSU, EF-1 α e ITS se identificó a *E. perseae* (Cuadro 3). Las secuencias de nucleótidos identificadas se depositaron en la base de datos del GenBank (Cuadro 4).

Análisis filogenético de los aislamientos obtenidos de frutos de aguacate con síntomas de “roña típica”. El árbol filogenético agrupó seis clados, además del grupo externo, de los cuales dos agrupan en su totalidad a la especie *C. gloeosporioides*, donde se encuentra la cepa identificada en el presente estudio. Esto corrobora la identidad de los aislamientos obtenidos en el presente estudio como *C. gloeosporioides* (Figura 4).

Análisis filogenético de las cepas aisladas de frutos de aguacate con síntoma de “mancha púrpura”. El árbol filogenético bayesiano agrupó a más de 14 clados, además del grupo externo. Las secuencias obtenidas de las cepas identificadas morfológicamente como *E. perseae* se agruparon con las cepas depositadas en el GenBank con la misma

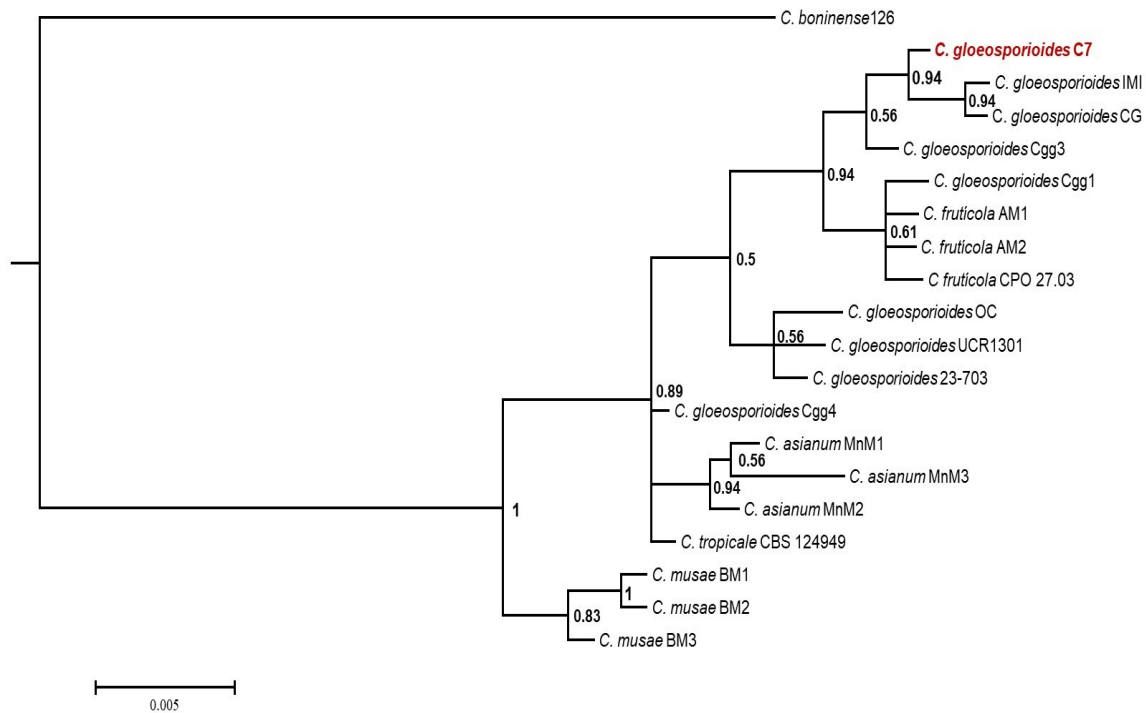


Figure 4. Bayesian phylogenetic tree for the complex *Colletotrichum gloeosporioides*, reconstructed using primers ITS5/ITS4. Red text is the isolation obtained in this work. The bar indicates substitution per site. Nodes exemplify the posterior probability (PP). *C. boninense*, isolation 126, which belongs to another complex of the genus, was used as an external group.

Figura 4. Árbol filogenético bayesiano para el complejo *Colletotrichum gloeosporioides*, reconstruido utilizando los iniciadores ITS5/ITS4. En color rojo se muestra el aislamiento obtenido en este trabajo. La barra indica la sustitución por sitio. En los nodos se ejemplifica la probabilidad posterior (PP). Se utilizó como grupo externo *C. boninense*, aislamiento 126, perteneciente a otro complejo del género.

***Pestalotiopsis* sp.** The symptom caused by the fungus identified as *Pestalotiopsis* sp. was dry necrosis, which moves up the stem until the base of the branch and caused the mummification of the fruits in plants of the varieties Hass and Flor de María. The least severe symptoms were found in creole plants and the variety Flor de María, causing a partial necrosis with vertical cracks; these symptoms coincide with reports by Tamayo (2007), such as the drying of branches and leaf spots.

Authors such as Morales *et al.* (2009) have isolated *Pestalotiopsis versicolor* from avocado

especie, lo que corrobora la identidad de las cepas aisladas del síntoma de “mancha púrpura” como *E. perseae* y soporta el origen monofilético de esta especie (Figura 5).

Pruebas de patogenicidad. Se inoculó con *Pestalotiopsis* sp. y *C. gloeosporioides* para evaluar el síntoma de “roña típica”; y con aislamiento identificado como *E. perseae* para evaluar el síntoma de “mancha púrpura”.

***Pestalotiopsis* sp.** El síntoma que ocasionó el hongo identificado como *Pestalotiopsis* sp., fue necrosis seca

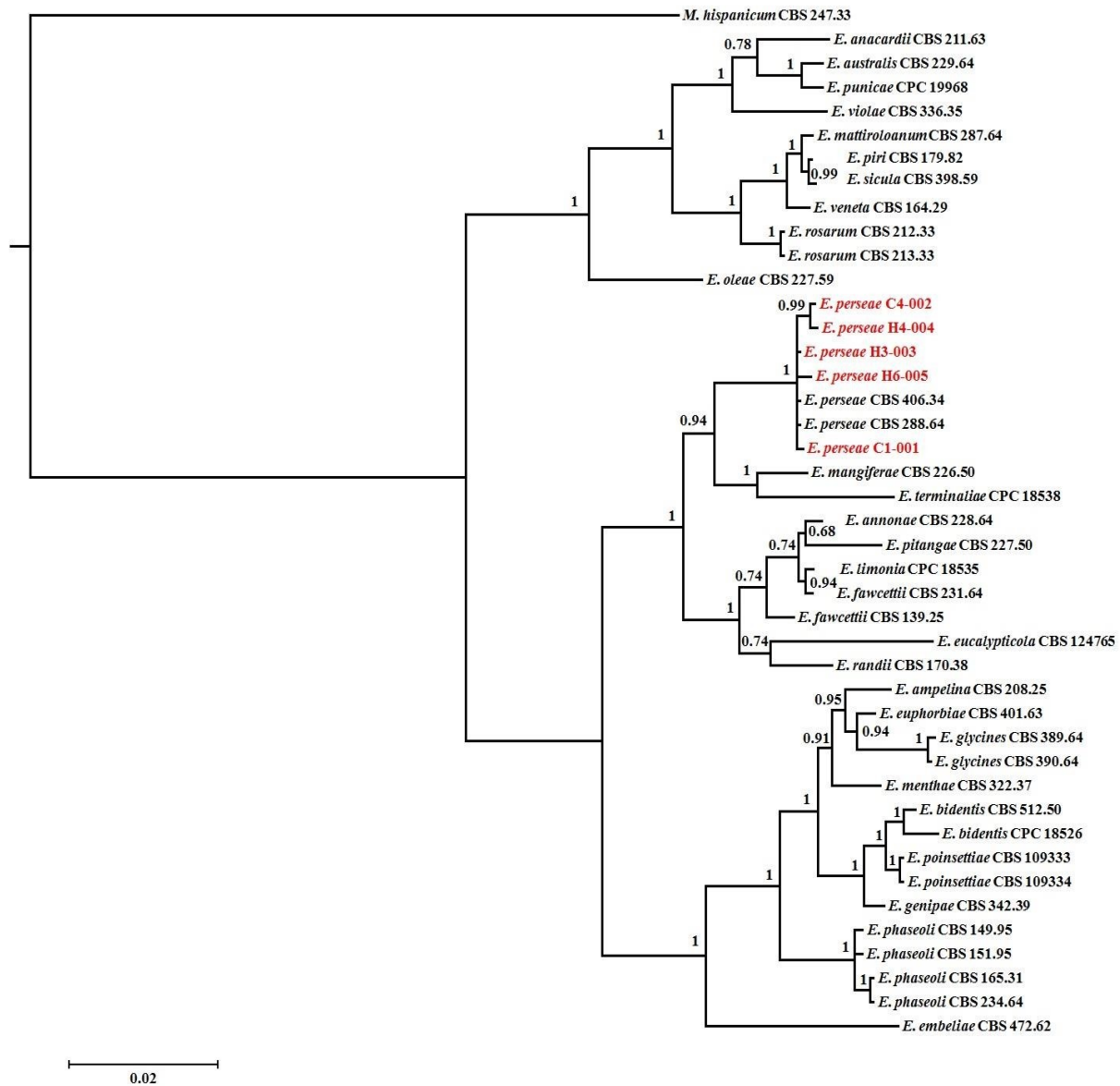


Figure 5. Bayesian phylogenetic tree for species of the genus *Elsinoe*, reconstructed using assembled sequences of primers ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, EF-1 α F/EF-1 α R, Sph1 F/Sph1 R. Red text indicates the isolations obtained in this work. The bar indicates substitution per site. Nodes exemplify the posterior probability (PP). *Myriangium hispanicum*, aislamiento CBS 227.59, which belongs to another family of the same genus, was used as an external group.

Figura 5. Árbol filogenético bayesiano para las especies del género *Elsinoe*, reconstruido utilizando secuencias ensambladas de los iniciadores ITS1/ITS4, ITS5/ITS4, EF-1 α F/EF-1 α R, Sph1 F/Sph1 R. En texto en color rojo se encuentran los aislamientos obtenidos en este trabajo. La barra indica la sustitución por sitio. En los nodos se ejemplifica la probabilidad posterior (PP). Se utilizó como grupo externo a la especie *Myriangium hispanicum*, aislamiento CBS 227.59, perteneciente a otra familia del mismo orden.

fruits with symptoms of anthracnose and *Pestalotiopsis* sp. from fruits with avocado scab symptoms. However, despite the inoculated strain of *Pestalotiopsis* sp. having reproduced a corky bark, the typical scab symptom observed in the field was not reproduced, therefore *Pestalotiopsis* sp. as the causal agent of typical scab was discarded.

Pestalotiopsis sp. species have been reported as pathogens of some varieties of avocado and other fruit trees such as mango, apple, banana and grape. However, the exact damage this fungus may cause in avocado fruits was unknown (Zhang *et al.*, 2003; Djeugap *et al.*, 2015). The pathogenicity tests carried out in this study showed that *Pestalotiopsis* sp. may cause a total dry necrosis of the fruit, to the extent of leaving it mummified, and in branches it causes necrosis with corky cracks. These symptoms are different to those reported for typical scab.

Colletotrichum gloeosporioides. The diseases caused by *Colletotrichum* sp. include anthracnose, rotting of fruits and flowers, leaf spot, and other types of rot. It affects a wide range of crops, including avocado (Freeman *et al.*, 1998; Silva and Ávila, 2011). Because it is a fungus of rapid growth, it can enter as a secondary pathogen by using lesions caused by other fungi such as *E. perseae*. Zentmyer (1984) described that *Colletotrichum* sp. is incapable of entering the fruit directly and it is generally established in the lesions of the fruit caused by *Cercospora* sp. or *E. perseae*. Therefore, *Colletotrichum* sp. may be found as an opportunist fungus.

The pathogenicity tests for the strain identified as *C. gloeosporioides* reproduced symptoms similar to the avocado scab, which proves that other pathogens can stimulate the production of layers of cork, as described by Cruz *et al.* (2006). Plants inoculated with the strain identified as *Colletotrichum* sp. displayed an initial symptom

que avanzó por el tallo hasta la base de la rama y provocó la momificación de los frutos en plantas de las variedades Hass y Flor de María. Los síntomas menos severos se encontraron en las plantas criollas y las de la variedad Flor de María, ocasionando una necrosis parcial con grietas verticales, estos síntomas concuerdan con lo reportado por Tamayo (2007), como secamiento de ramas y mancha foliar.

Autores como Morales *et al.* (2009), han aislado a *Pestalotiopsis versicolor* de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis y a *Pestalotiopsis* sp. de frutos con síntomas de roña del aguacate. Sin embargo, a pesar de que la cepa de *Pestalotiopsis* sp. inoculada reprodujo una corchosis, no se replicó el síntoma típico de roña observado en campo, por lo que se descarta a *Pestalotiopsis* sp. como el agente causal de la roña típica.

Se han reportado especies de *Pestalotiopsis* sp. como patógenos de algunas variedades de aguacate y otros frutales como mango, manzana, plátano y uva. Sin embargo, se desconocía con exactitud los daños que puede causar este hongo en el fruto de aguacate (Zhang *et al.*, 2003; Djeugap *et al.*, 2015). En las pruebas de patogenicidad, realizadas en el presente estudio se comprobó que *Pestalotiopsis* sp. puede ocasionar una necrosis seca total del fruto, hasta dejarlo momificado, y en ramas provoca necrosis con agrietamientos corchosos. Estos síntomas son diferentes a los reportados para la roña típica.

Colletotrichum gloeosporioides. Las enfermedades causadas por *Colletotrichum* sp. incluyen la antracnosis, podredumbre de frutos y flores, la mancha foliar, entre otros tipos de pudriciones; afecta a una amplia gama de cultivos, entre los que destaca el aguacate (Freeman *et al.*, 1998; Silva y Ávila, 2011). Al ser un hongo de rápido crecimiento, puede entrar como patógeno secundario al aprovechar las lesiones que provocan otros hongos como *E.*

of necrotic spots that formed corky cracks during growth, similar to those described by Everett *et al.* (2011) and Fan *et al.* (2017), caused by *E. perseae*. In stems, symptoms of necrosis were found with longitudinal cracks, similar to those reported by *Pestalotiopsis* sp., whereas in soft branches and the peduncle, the symptom was similar to the one described by Everett *et al.* (2011) as avocado scab.

***Elsinoe perseae*.** The isolation morphologically described as *E. perseae* was obtained from fruits with the symptom of “purple spot”. The initial symptoms were reproduced, which are commonly found in the field, similar to those reported by Morales (2017), and at the same time, the initial lesions coincide with reports by Jenkins in 1934 as avocado scab (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017), therefore it is synonymous with purple spot described by Morales (2017). This describes that these common names are synonymous and they are related to the same causal agent. Small circular lesions or lesions with irregular purple to violet edges were observed. It was evaluated for two months and at the end of the evaluation, the lesions reached a maximum size of 5 mm. The symptoms produced on the fruits were reisolated and the isolations obtained coincided morphologically with the inoculated strains (Figure 6).

Everett *et al.* (2011) and Fan *et al.* (2017) related *Elsinoe perseae* as the causal agent of the avocado scab. Another situation is the erroneous identification of the symptom of this disease in the field, because in the sampling of this work, other pathogens, pests and mechanical damages were proven to cause corky trunk in the pericarp of the fruit as a defense mechanism (Cruz, 2006). Therefore, the characterization and identification of the symptom is crucial for the adequate integrated management of this disease.

perseeae. Zentmyer (1984) describió que *Colletotrichum* sp. es incapaz de entrar directamente en el fruto y generalmente se establece en las lesiones del fruto causadas por *Cercospora* sp. o *E. perseae*. Por lo tanto, es posible que *Colletotrichum* sp. se encuentre como un hongo oportunista.

Las pruebas de patogenicidad para la cepa identificada como *C. gloeosporioides* reprodujeron síntomas similares a la roña del aguacate, lo que comprueba que otros patógenos pueden estimular la producción de capas de corcho como lo describieron Cruz *et al.* (2006). Las plantas inoculadas con la cepa identificada como *Colletotrichum* sp. presentaron en el fruto un síntoma inicial de manchas necróticas que al crecer formaron grietas de aspecto corchoso, similares a las descritas por Everett *et al.* (2011) y Fan *et al.* (2017) ocasionadas por *E. perseae*. En tallos se observaron síntomas de necrosis con grietas longitudinales, similares a los reproducidos por *Pestalotiopsis* sp.; mientras que, en ramas tiernas y pedúnculo, el síntoma fue similar a lo descrito por Everett *et al.* (2011) como roña del aguacate.

***Elsinoe perseae*.** El aislamiento identificado morfológicamente como *E. perseae*, se obtuvo de frutos con el síntoma de “mancha púrpura”. Se reprodujeron los síntomas iniciales, los cuales son comúnmente encontrados en campo, semejante a los reportados por Morales (2017) y a su vez las lesiones iniciales coinciden con lo reportado por Jenkins en 1934 como la roña del aguacate (Everett *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2017), por lo que es sinónimo de la mancha purpura descrita por Morales (2017). Esto demuestra que estos nombres comunes son sinónimos y están asociados al mismo agente causal. Se observaron lesiones circulares pequeñas o con borde irregular de color oscuro a violáceos. Se evaluó durante dos meses y al final de la evaluación las lesiones alcanzaron un tamaño máximo de 5 mm.



Figure 6. Symptoms in fruits inoculated with A) *Elsinoe perseae*, B) *Pestalotiopsis* sp. and C) *Colletotrichum gloeosporioides*.
Figura 6. Síntomas en frutos inoculados con: A) *Elsinoe perseae*, B) *Pestalotiopsis* sp. y C) *Colletotrichum gloeosporioides*.

CONCLUSIONS

Sixteen different isolations were obtained, of the genera *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* and *Epicoccum* associated with the symptom “typical scab”

Colletotrichum gloeosporioides did not reproduce symptoms identical to those of “typical scab” in the pathogenicity tests, since the corky bark produced penetrated the mesocarp. Meanwhile, *Pestalotiopsis* sp. Reproduced descending anthracnose and mummification of the fruits.

Twenty-five isolates of the purple blotch symptom were obtained and corresponded to the genus *Elsinoe*

The fungus identified as *E. perseae* initially reproduced irregular brown to violet spots that formed a corky bark limited to the epicarp when they joined; these symptoms are related to the disease known as “purple spot”.

Se realizó un reaislamiento de los síntomas producidos en los frutos y se obtuvieron aislamientos que coincidieron morfológicamente con las cepas inoculadas (Figura 6).

Everett *et al.* (2011) y Fan *et al.* (2017) relacionan a *Elsinoe perseae* como agente causal de la roña del aguacate. Otra situación, es la identificación errónea del síntoma de esta enfermedad en campo ya que en los muestreos de este trabajo se comprobó que otros patógenos, plagas y daños mecánicos pueden provocar corchosis en el pericarpio del fruto como mecanismos de defensa (Cruz, 2006). Por lo que, la caracterización e identificación del síntoma es de suma importancia para realizar un manejo integrado adecuado de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 16 aislamientos diferentes, los cuales corresponden a los géneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Leptosphaerulina*, *Cladosporium* y *Epicoccum* asociada al síntoma de “roña típica”

The presence of *E. perseae* in Michoacán has been corroborated.

LITERATURE CITED

- Alfaro EE, Morales GJL, Pedraza SME, Chávez BAT y Morales MKL. 2017. Hongos asociados al síndrome de la roña del aguacate en el estado de Michoacán, México. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. Ciudad Guzmán, Jalisco, México. 1: 114-125. http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_181.pdf.
- Álvarez E, Mejía JF, and Valle TL. 2003. Molecular and pathogenicity characterization of *Sphaceloma manihoticola* isolates from south-central Brazil Plant Disease 87:1322-1328. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.11.1322>
- Anguiano CJ, Alcántar RJ, Toledo BR, Tapia VL, Ruíz CJ, Rodríguez CY. 2006. Caracterización edafo-climática del área productora de aguacate de Michoacán. INIFAP, Libro Técnico 4: 98-195. <http://www.avocadosource.com/wac6/es/Extenso/3c-112.pdf>
- Ayala EV, Santiago SV y Nava DC. 2016. Characterization of *Elsinoe pyri* associated with Apple scab in Texcoco, Mexico. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología. 34: 42-43. https://www.smf.org.mx/rmf/suplemento/docs/Volumen342016/Resumen_Poster_S342016.pdf
- Barnett HL y Hunter BB. 2006. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Edition, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota. 1-217. https://www.academia.edu/35499449/Illustrated_genera_of_imperfect_fungi_fourth_edition_Barnett_y_Hunter_pdf_pdf
- Becerra MD. 2019. Síndrome de roña en aguacate Hass y criollos: hongos asociados, cambios fisiológicos, físicos y químicos. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Agroalimentarias. Universidad Autónoma Chapingo. 1-142. <http://repositorio.chapingo.edu.mx:8080/handle/20.500.12098/22>
- Cruz BM, Hernández FY y Rivas FE. 2006. Mecanismos de Resistencia de las Plantas al Ataque de Patógenos y Plagas. Temas de Ciencia y Tecnología, 10: 45-54. <https://biblat.unam.mx/es/revista/temas-de-ciencia-y-tecnologia/articulo/mecanismos-de-resistencia-de-las-plantas-al-ataque-de-patogenos-y-plagas>
- Djeugap FJ, Tsombeng NG, Keuete KE, Yaouba A y Serferbe S. 2015. Isolation and identification of fungi associated with avocado fruits from local markets of the west region of Cameroon. International Journal of Agriculture and Biosciences 4: 64-68. <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.1.9>
- Everett KR, Rees GJ, Pushparajah IPS, Manning MA and Fullerton RA. 2011. Molecular Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* no reprodujo síntomas idénticos a la “roña típica” en las pruebas de patogenicidad ya que la corchosis producida penetró al mesocarpio. Mientras que, *Pestalotiopsis* sp. reprodujo antracnosis descendente y momificación de los frutos.
- Se obtuvieron 25 aislamientos del síntoma de mancha púrpura que correspondieron al género *Elsinoe*.
- El hongo identificado como *E. perseae* inicialmente reprodujo manchas irregulares de color marrón a violáceas que al crecer y unirse formaron una corchosis limitada al epicarpio, síntomas asociados a la enfermedad conocida como “mancha púrpura”. Se corrobora la presencia de *E. perseae* en Michoacán.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- Sphaceloma perseae* (Avocado Scab) and its absence in New Zealand. Journal of Phytopathology 159: 106-113. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01739.x>
- Fan XL, Barreto RW, Groenewald JZ, Bazerra JDP, Preira OL, Cheewangkoon R, Mostert L, Tian CM and Crous PW. 2017. Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoe* (Myrangiiales Dothideomycetes) Stud Mycol. 87:1-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2017.02.001>
- Freeman S, Katan T, and Shabi E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. Plant Disease 82: 00. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.596>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41: 95-98. <https://thalljscience.github.io/>
- Hernández y González ME. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*. 31:00 http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362010000400015&lng=es&tlng=es.
- Holder MT y Lewis PO. 2003. Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. Nature Reviews Genetics, 4: 275-284. <http://www.apeamac.com/exportaciones-de-aguacates-de-mexico-a-estados-unidos>.
- Hyde KD, Jones EG, Liu JK, Ariyawansa H, Boehm E, Boonmee S, Braun U, Chumnunti P, Crous PW, Dai DQ, Diederich P, Dissanayake A, Doilom M, Doveri F,

- Hongsanan S, Jayawardena R, Lawrey JD, Li YM, Liu YX, Lucking R, Monkai J, Muggia L, Nelsen MP, Pang KL, Phookamsak R, Senana IC, Shearer CA, Suetrong S, Tanaka K, Thambugala KM, Wijayawardene NN, Wikee S, Wu H, Zhang Y, Aguirre HB, Alias SA, Aptroot A, Bahkali AH, Bezerra JL, Bhat DJ, Camporesi E, Chukeatirote E, Gueidan C, Hawksworth DL, Hirayama K, Hirayama S, Kang J, Knudsen K, Li W, Li X, Liu Z y Mapook A. 2010. Families of dothideomycetes. *Fungal diversity*, 63: 1-313. doi:10.1007/s13225-013-0263-4
- Katoh K y Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones HS, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P and Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Maddison WP y Maddison DR. 2016. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis version 3.6. [Internet]. Available from: <http://mesquiteproject.org>
- Morales GJL. 2017. Estado actual de las enfermedades del fruto del aguacate en México: roña y antracnosis. 118-121. Nuestro mexico.com, <http://www.nuestro-mexico.com/Michoacan-de-Ocampo/Ziracuaretiro/Areas-de-menos-de-500-habitantes/El-Copal/> consultada el 13 de diciembre del 2021
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala, Sweden: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. https://www.researchgate.net/publication/285805344_MrModeltest_V2_Program_Distributed_by_the_Author
- Pérez AS, Leyva López NE, Magallanes-Tapia M. A., Arce-Leal P. y Méndez-Guerrero A. 2016. Contaminant fungi *in vitro* establishment of potato apices. *Cultrop*. 37: 84-88. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.26063.69284>
- Pérez R. M. 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2: 01-24. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0806/EJPSB_2\(1\)/EJPSB_2\(1\)1-24o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/0806/EJPSB_2(1)/EJPSB_2(1)1-24o.pdf)
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ and Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products* 80: 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Réblova M, Gams W and Seifert KA. 2011. Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. *Studies in Mycology* 68:163-191. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2011.68.07>
- Ronquist F, Teslenko M, Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA and Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2018. Manual de Identificación de las Principales Plagas del Aguacate en México. <https://www.gob.mx/senasica>. (Consulta septiembre del 2021).
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2022. Escenario mensual de productos agroalimentarios. <https://www.gob.mx/siap> (Consulta octubre de 2022).
- Silva RHV y Ávila QGD. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60: 899–908.
- Tamayo MPJ. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica*, 3: 51-70. <https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/62>
- Tamayo-Molano PJ. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica*, 3:51-70. <https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/article/view/62>
- Urrea JCF, y Cardona CJE 2020. Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades en aguacate Hass (*Persea americana*) en el departamento de Caldas. Programa de Agronomía Manizales. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/38446>
- Zentmyer GA. 1984. Avocado diseases. *Tropical Pest Management*, 30: 388–400. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670878409370915>
- Zhang J., Xu T. y Ge Q. 2003. Notes on Pestalotiopsis from southern China. *Mycotaxon*, 85: 91-92. https://www.researchgate.net/publication/296529293_Notes_on_Pestalotiopsis_from_southern_China
- Zhi L, Huan D, Xiao Y, Jingyuan H, Zhiqi H and Xiping W. 2018. Morphological characterization and optimization of conditions for conidial production of *Elsinoë ampelia*, the causal organism of grapevine anthracnose. *Journal of phytopathology*. 166: 1-9. <https://doi.org/10.1111/jph.12702>