

***Lasiodiplodia* spp., AGENTE CAUSAL DE MUERTE REGRESIVA EN ÁRBOLES DE AGUACATE EN SABINAS HIDALGO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

Cantú-Treviño, Karen Guadalupe¹; Gutiérrez-Díez, Adriana¹; Ochoa-Ascencio, Salvador²; Olivares-Sáenz, Emilio¹; García-Zambrano, Eduardo A.¹

¹Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Francisco Villa S/N Col. Ex Hacienda El Canadá, Gral. Escobedo, Nuevo León. Tel: (81)1340 4399. Correo-e: karen.cantutrv@uanl.edu.mx

²Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, Emiliano Zapata, Melchor Ocampo, Uruapan, Michoacán.

Resumen

La muerte regresiva de ramas de aguacate (*Persea americana* Mill.) es una enfermedad que se ha reportado en diferentes regiones donde se cultiva esta especie frutal. Diversos estudios han señalado la presencia de especies de Botryosphaeriaceae asociadas a canchros y muerte regresiva de ramas de aguacate. El presente estudio se llevó a cabo en seis huertas de aguacate en el municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León, México, con presencia de árboles con síntomas de muerte regresiva de ramas. De las muestras se obtuvieron 14 aislados fúngicos y se identificó por morfología y amplificación por PCR de la región espaciadora transcrita interna y un segmento del gen de β -tubulina a *Lasiodiplodia* spp. a partir de un aislado representativo. La patogenicidad del aislado fue comprobada por inoculación de discos de micelio en ramas de aguacate.

Palabras clave: Botryosphaeriaceae, canchros, *Persea americana*, ITS.

***Lasiodiplodia* spp., CAUSAL AGENT OF REGRESSIVE DEATH ON AVOCADO TREES AT SABINAS HIDALGO, NUEVO LEÓN, MEXICO**

Abstract

The dieback of branches in avocado (*Persea americana* Mill.) is a disease that has been reported in different regions where this fruit species is cultivated. Various studies have pointed out the presence of Botryosphaeriaceae species associated with cankers and the dieback of avocado branches. The present study was carried out in six avocado orchards in Sabinas Hidalgo, Nuevo León, Mexico, with the presence of trees with symptoms of dieback branch. Fourteen fungal isolates were obtained from the samples and were identified by morphology and PCR amplification of the internal transcribed spacer region and a segment of the β -tubulin gene to *Lasiodiplodia* spp. from a representative isolate. The pathogenicity of the isolate was verified by inoculation of mycelium discs in avocado branches.

Key words: Botryosphaeriaceae, cankers, *Persea americana*, ITS.

Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es uno de los frutos con mayor exportación dentro del sector agroalimentario mexicano (SAGARPA, 2017). México es el principal proveedor del mercado internacional, aportando el 44 % de la demanda mundial.

El aguacate como muchas otras especies frutales, durante sus diferentes etapas de desarrollo sufre el ataque de agentes fitopatógenos que causan enfermedades que limitan el desarrollo del

árbol, con efectos directos sobre la producción y la vida útil de los árboles. Una de las enfermedades que se observa con mayor frecuencia en los últimos años es la muerte regresiva de ramas que se manifiesta con síntomas de marchitez, necrosis en la zona externa de la corteza de las ramas afectadas, y en los vasos conductores del xilema, en donde se desarrolla una coloración rojiza o marrón oscuro especialmente en los puntos de ramificación. Con frecuencia se ha observado la presencia de exudados en las zonas necrosadas (Arjona-Girona et al., 2015; Becerra et al., 2019).

En 2011, McDonald y Eskalen identificaron diversas especies de Botryosphaeriaceae como los hongos más abundantes en aislados de ramas, en plantaciones de aguacate cv. Hass con presencia de muerte regresiva y canchros en California, Estados Unidos. En 2015, Arjona-Girona et al., identificaron a *Neofusicoccum parvum* como el principal agente causal de muerte regresiva de ramas de aguacate cv. Hass en huertas comerciales en España con una incidencia del 50 %; los autores citados indican que el inóculo del hongo tiende a aumentar debido a la mala gestión de poda, en donde las ramas son a menudo trituradas y mezcladas con el suelo en lugar de ser quemadas.

Valencia et al. (2019), identificaron ocho especies de la familia Botryosphaeriaceae como causantes de muerte regresiva y canchros de ramas en árboles de aguacate Hass, en Chile. Las especies fueron identificadas como *Diplodia mutila*, *D. pseudoseriata*, *D. seriata*, *Dothiorella iberica*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum australe*, *N. nonquaesitum* y *N. parvum*.

El estado de Nuevo León en México forma parte del centro de origen del aguacate raza Mexicana (var. *drymifolia*), las variedades Fuerte, Hass, Ryan y Bacon son productos de cruces entre las razas Mexicana y Guatemalteca. En el municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León, son cultivados materiales de criollos raza Mexicana en huertos comerciales y de traspatio donde se han identificado criollos mejorados como 'Anita', 'Floreño', 'Negro Santos' y 'Pepe' (Acosta et al., 2013; Gutiérrez-Díez et al., 2015; Newett et al., 2002). En este municipio, se han detectado árboles de aguacate raza Mexicana con síntomas de muerte regresiva sin que se tenga a la fecha reporte de la causa de esta patología. La determinación del agente causal puede contribuir al conocimiento y manejo integral de la enfermedad en la región, así como a la conservación de materiales con potencial de uso comercial. El objetivo general de este estudio fue identificar el agente causal de muerte regresiva en árboles de aguacate variedad *drymifolia*, en huertas de Sabinas Hidalgo, Nuevo León, México.

Materiales y Métodos

Área del estudio y detección de árboles con síntomas de muerte regresiva

El estudio se llevó a cabo en el municipio de Sabinas Hidalgo, Nuevo León, México. Se realizaron recorridos en seis huertas de aguacate raza Mexicana, detectando árboles con síntomas y signos de muerte regresiva, para la colecta de muestras de ramas y brotes de cinco árboles en cada una de las huertas.

Aislamiento y caracterización morfológica

Las muestras recolectadas fueron transportadas al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía-UANL para su manejo y establecimiento en medio de cultivo. Se realizó una previa desinfección de las muestras con hipoclorito de sodio al 2 %, el material fue sembrado en placas Petri con medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) (MCD-Lab) acidificado (ácido tartárico al 10 %) y fueron incubados a 30 °C en oscuridad durante 3 días; los hongos obtenidos fueron sembrados en placas Petri con medio PDA acidificado, para la obtención de colonias puras a partir de cultivo monospórico o punta de hifa. A partir de las colonias puras se obtuvieron dos placas Petri, una para identificación morfológica de acuerdo con lo reportado por Phillips et al. (2013), y otra para realizar extracciones de ADN de acuerdo con el protocolo de Cenis (1992), para la identificación molecular.

Identificación morfológica y molecular

Las colonias puras obtenidas se identificaron con base en su morfología y características, comparándolas con los estudios de Phillips et al. (2013). Para la identificación molecular se realizó la amplificación de la región espaciadora transcrita interna (ITS) y un segmento del gen de β -tubulina (Bt) para su posterior secuenciación e identificación a través de la comparación con secuencias del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). La amplificación de la región ITS se realizó con los iniciadores ITS5 e ITS4, mientras que la amplificación de la región del gen Bt se realizó con los iniciadores Bt2a y Bt2b.

Cada mezcla de reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 12.5 μ L, la composición de la mezcla de reacción incluyó 20 ng de DNA total, 2.5 mM de MgCl₂, 1x Buffer *Taq* polimerasa, 0.02 mM de dNTP mix, 0.02 pmol de cada iniciador y 0.25 U de *Taq* polimerasa. El programa térmico para la amplificación de los ITS y Bt consistió en un ciclo inicial a 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 58 °C (ITS) y 54 °C (Bt) por 30 s, 72 °C por 90 s, y un ciclo final a 72 °C

durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1 %, utilizando un marcador de peso molecular de 1 Kb.

Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad de los aislados fue determinada mediante la inoculación de discos de micelio en cinco ramas jóvenes y sanas de dos árboles de aguacate de 1.5 cm de diámetro. Las ramas inoculadas se mantuvieron en ambiente húmedo en un recipiente hermético durante 7 y 15 días en incubación a 30 °C. A partir de las ramas con síntomas de necrosis se realizaron aislados en medio PDA acidificado; de las colonias obtenidas de la inoculación de ramas fueron generadas las amplificaciones de la región ITS y Bt. Las secuencias resultantes fueron alineadas y comparadas por homología (99-100 %) con las secuencias de la base de datos del banco de genes NCBI.

Resultados y Discusión

Área del estudio y detección de árboles con síntomas de muerte regresiva

Durante los recorridos por las huertas se observaron árboles con síntomas de muerte regresiva en ramas, y ramas con canchros y exudados gomosos. Al realizar cortes transversales de ramas con síntomas se apreciaba la coloración marrón claro y el tejido necrosado con coloración marrón oscuro; así como exudados de color blanquecino, de consistencia grumosa y corteza necrosada (Figura 1).

Los síntomas observados concuerdan con los resultados obtenidos por Alama et al. (2006), mencionan la presencia de exudados grumosos y blanquecinos de diversos tamaños y una localización de manera indistinta de los canchros en las ramas y troncos de árboles afectados. En cortes longitudinales de la corteza en la zona de los canchros se presentó tejido necrosado de color marrón oscuro.

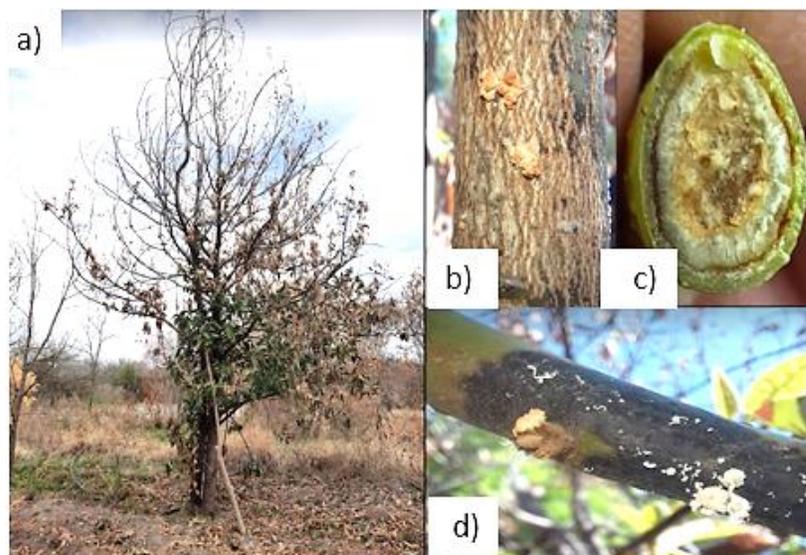


Figura 1. Síntomas de muerte regresiva en árboles de aguacate en Sabinas Hidalgo, N.L. a) Ramas con muerte descendente, b-d) Lesiones en ramas: canchros y exudados gomosos (b), coloración del tejido afectado en corte transversal de rama (c), exudados (d).

Aislamiento y caracterización morfológica

En los muestreos realizados en cinco de las seis huertas recorridas se obtuvo un total de 14 aislados (Figura 2), de los cuales a la fecha se tienen cuatro cultivos monospóricos, como aquellos que se obtuvieron en las huertas H1 y H2 (Fig. 3, A-D).



Figura 2. Aislados de hongos obtenidos de ramas de aguacate, en huertas de Sabinas Hidalgo, N.L.

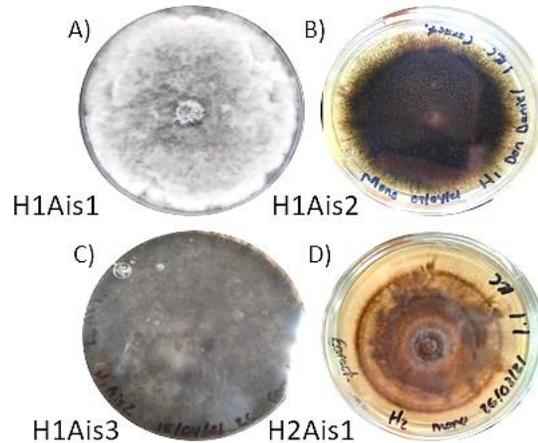


Figura 3. Cultivos monospóricos obtenidos. A-C) Cultivos monospóricos de H1, D) Cultivo monospórico de H2.

Actualmente, se cuenta con la caracterización morfológica del aislado H1Ais1 obtenido de la huerta uno (H1). Las colonias en medio PDA presentaron crecimiento de micelio aéreo algodonoso, al inicio de color blanco y se tornaron de color gris a los siete días de incubación, con el tiempo se volvieron de color negro y una formación de picnidios en un tiempo aproximado de 4 semanas. En los picnidios se forman los conidios hialinos y aseptados cuando están inmaduros y marrones septados con estrías longitudinales cuando están maduros.

Identificación morfológica y molecular

La identificación morfológica fue realizada de acuerdo con Phillips et al. (2013). En el caso del aislado H1Ais1 se obtuvo a *Lasiodiplodia*, presentó conidios marrones que permanecieron hialinos durante algún tiempo antes de volverse marrones, se formaron dentro de un picnidio y presentó paráfisis (Figura 4).

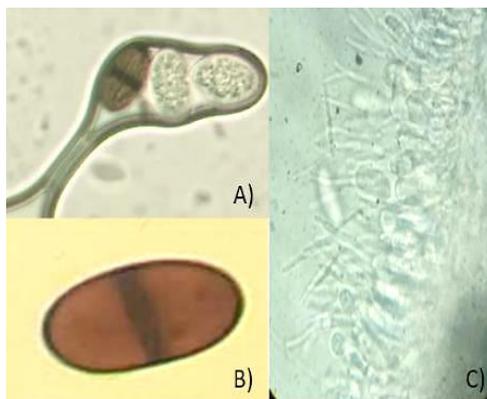


Figura 4. H1Ais1. A) Conidios, B) Conidio marrón maduro, C) Capa conidiogena con paráfisis.

En la Figura 5 se observó los amplicones (aproximadamente 550 pb) generados con los iniciadores ITS5/ITS4. La región ITS completa se ha dirigido comúnmente con enfoques de secuenciación Sanger tradicionales y generalmente oscila entre 450 y 700 pb (Bellemain et al., 2010). De acuerdo con la comparación de las secuencias resultantes con la base de datos del NCBI, se obtuvo con un porcentaje de identidad del 100 % con más de ocho especies de *Lasiodiplodia*: *L. mahajangana*, *L. citricola*, *L. theobromae*, *L. lignicola* y *L. parva*. Por otro lado, los amplicones generados con los iniciadores Bt2a/Bt2b son de aproximadamente 500 pb. En el resultado de la comparación de las secuencias se obtuvo un porcentaje de identidad del 100 %, seis especies de *Lasiodiplodia*: *L. citricola*, *L. theobromae*, *L. caatinguensis*, *L. magnoliae*, *L. mahajangana* y *L. exigua*. Aún falta terminar con la amplificación de la subunidad pequeña del gen ribosomal nuclear, un segmento de la subunidad grande del gen ribosomal RNA ribosomal y un segmento del factor de alargamiento 1- α .

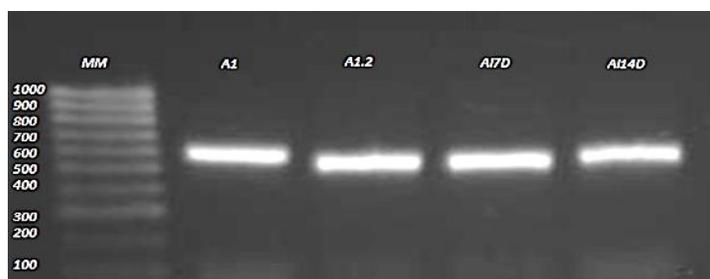


Figura 5. Productos de amplificación correspondientes a la región espaciadora transcrita (ITS) de aislados de ramas de aguacate con síntomas de muerte regresiva.

Pruebas de patogenicidad

De acuerdo con las pruebas de patogenicidad realizadas, se presentaron síntomas de necrosis después de 7 y 14 días (Figura 6). A partir del tejido dañado de las ramas inoculadas, se realizaron aislados para verificar la presencia del hongo inoculado y la posterior confirmación mediante PCR.

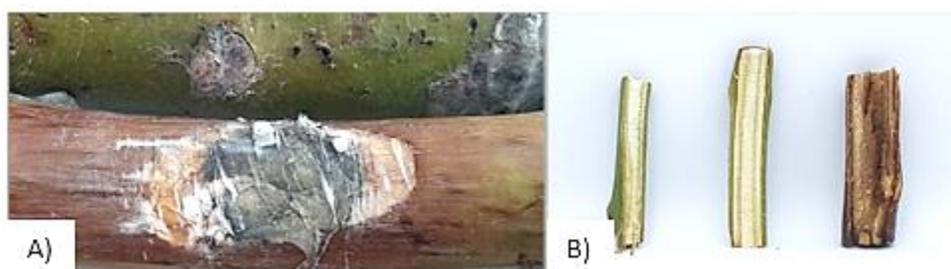


Figura 6. A) Resultados de inoculación de ramas de aguacate jóvenes y sanas a los siete días, B) Corte longitudinal de ramas sin y con inoculación a los 14 días.

La infección por las diversas especies de *Lasiodiplodia* se caracteriza por la presencia de síntomas como canchros, lesiones necróticas y muerte regresiva de ramas, los cuales conducen a la muerte de la planta (Coutinho et al., 2017). El estudio realizado por Arjona-Girona et al. (2015), mostró diversidad y alta incidencia de aislados fúngicos asociados a la muerte regresiva de árboles de aguacate en el sur de España, en su estudio obtuvieron tres géneros, entre ellos *Lasiodiplodia*.

Además del cultivo de aguacate, varias especies de *Lasiodiplodia* han sido reportadas causando canchros, gomosis, pudrición del pedúnculo del fruto y muerte descendente, en diversos hospedantes en México como: limón persa en Morelos (Guillén-Sánchez et al., 2019), mango en Guerrero (Sandoval-Sanchez et al., 2013) y uva en Sonora y Baja California (Úrbez-Torres et al., 2008).

Literatura Citada

- Acosta, E., I.H. Almeyda, y I. Hernández. 2013. Evaluación de aguacates criollos en Nuevo León, México: región norte. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 4:531-542.
- Alama, I., E. Maldonado, y E. R. Gálvez. 2006. *Lasiodiplodia theobromae* afectando el cultivo de palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. Universalia 11:4-13.
- Arjona-Girona, I., M. T Ariza-Fernández, D. Sarmiento, J. Navarro, V. Ruiz, y C. López-Herrera. 2015. Hongos patógenos aéreos asociados con la muerte regresiva en ramas de aguacate en el sur de España. pp.154-158. In: Proceedings of the VIII World Avocado Congress vol. 1. Septiembre 13-18, 2015. Lima, Perú.
- Becerra, D., J.E. Corrales, A. Almaraz, V. Ayala, and D. Nieto. 2019. First Report of *Neofusicoccum parvum*, causal agent of dieback on 'Hass' avocado branches (*Persea americana* cv. Hass) in Atlixco, México. Plant Dis. 103:3283.
- Bellemain, E., T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberlet, and H. Kausarud. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiol. 10:1-9.
- Coutinho, I. B. L., F. C. O. Freire, C. S. Lima, J. S. Lima, F. J. T. Gonçalves, A. R. Machado, and J. E. Cardoso. 2017. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. Plant Pathol. 66:90-104.
- Cenis, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Res. 20:2380.
- Guillén-Sánchez, D., D. Perales-Rosas, V. López-Martínez, P. Juárez-López, E. Martínez-Fernández, M. Hernández-Arenas, y A.R. Gijón-Hernández. 2019. Distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa en Morelos, México. Rev. Mex. Fitopatol. 37:464-478.
- Gutiérrez-Díez, A., E. I. Sánchez-González, J. A. Torres-Castillo, I. M. Cerda-Hurtado, and M. del C. Ojeda-Zacarías. 2015. Genetic diversity of mexican avocado in Nuevo Leon, Mexico. pp.141-159. In: M.



- Çalışkan, G. C. Öz, I. H. Kavakli, and B. Ozcan (Eds.). Molecular Approaches to Genetic Diversity. IntechOpen, London, UK.
- McDonald, V., and A. Eskalen. 2011. *Botryosphaeriaceae* species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Dis.* 95:1465-1473.
- Newett, S. D. E., J. H. Crane, and C. F. Balerdi. 2002. Cultivars and rootstocks. pp. 161-187. In: A.W. Whiley, B. Schaffer, and B.N. Wolstenholme. (Eds.). *The Avocado, Botany, Production and Uses*. CABI. London, UK.
- Phillips, A. J., A. Alves, J. Abdollahzadeh, B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Stud. Mycol.* 76:51-167.
- SAGARPA. 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 Aguacate mexicano. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Consultado en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257067/Potencial-Aguacate.pdf>
- Sandoval-Sánchez, M., D. Nieto-Ángel, J. S. Sandoval-Islas, D. Téliz-Ortiz, M. Orozco-Santos, y H. Silva-Rojas. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47:61-73.
- Úrbez-Torres, J. R., G. M. Leavitt, J. C. Guerrero, J. Guevara, and W. D. Gubler. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Dis.* 92:519-529.
- Valencia, A. L., P. M. Gil, B. A. Latorre, and I. M. Rosales. 2019. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species obtained from avocado trees with branch canker and dieback and from avocado fruit with stem end rot in Chile. *Plant Dis.* 103:996-1005.