



Caracterización biológica y molecular de especies nectriales asociadas a un síndrome de declinamiento del aguacate

Jeny Michua-Cedillo, ¹Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario BioLab, 1^a Priv. De Manuel Pérez Coronado 496 CP 60080, Uruapan, Mich.; Gustavo Mora-Aguilera*, ²CP-LANREF, Programa Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco, Edo. México, CP 56230; Gerardo Acevedo-Sánchez, ²Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF).

***Autor de Correspondencia:**

Gustavo Mora-Aguilera
morag@colpos.mx

Sección:

Edición periódica

Recibido:

30 Julio, 2024

Aceptado:

22 Diciembre, 2024

Publicado:

31 Diciembre, 2024

Adelantada 2025

Cita:

Michua-Cedillo J, Mora-Aguilera G y Acevedo-Sánchez G. 2025. Caracterización biológica y molecular de especies nectriales asociadas a un síndrome de declinamiento del aguacate. Revista Mexicana de Fitopatología 43(1): 51. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2406-7>

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. Miembros de Nectriaceae se han detectado en Michoacán desde 2019. Sin embargo, su detección no ha tenido el enfoque etiológico primario por lo que se desconoce la identidad de especies en raíz, distribución geográfica y asociación con otras familias. El objetivo fue caracterizar biológica y molecularmente especies nectriales asociadas al aguacate (*Persea americana*).

Materiales y Métodos. Se procesaron 70 muestras compuestas de raíces provenientes de árboles de aguacate con marchitez detectados en huertos comerciales de 13 municipios de Michoacán. Treinta aislados seleccionados con criterios epidemiológicos se cultivaron en extracto malta-agar, PDA y avena-agar para caracterización cultural y morfológica. A partir del ADN micelial se amplificaron los genes TEF *1-α* y RPB2, las secuencias se limpiaron y alinearon con SeqAssessment y MAFFT, respectivamente. Se aplicaron algoritmos filogenéticos de inferencia Bayesiana y máxima parsimonia mediante PAUP4.0 y MrBayes3.2 complementándose con 66 y 65 secuencias del GenBank para TEF *1-α* y RPB2, respectivamente. Cuatro especies de Hypocreales y *S. chartarum* se emplearon como especies externas.

Resultados. Se obtuvieron cinco morfotipos de nectriales con crecimiento radial variable y coloración marrón. Se identificaron tres géneros y tres especies con TEF *1-a* (>97% homología) y tres géneros y cinco especies con RPB2 (>97% homología) correspondientes a *Ilyonectria* (56% de los aislados), *Dactylonectria* (33 %), *Mariannaea* (6 %) y *Thelonectria* (3 %). En raíz, con niveles de daño variable, se observaron asociaciones significativas ($p \leq 0.05$) entre especies nectriales con *Armillaria* (97.1 %), *Fusarium* (92.9 %), *Paecilomyces* (56.4 %) y *Mortierella* (47.3 %), no así con *Phytophthora* ($r < -0.07$). Regionalmente, *Ilyonectria liriodendry* fue la más prevalente, preponderantemente asociada con *Fusarium* y/o *Armillaria*. El sur del municipio de Tacámbaro tuvo la mayor diversidad de especies nectriales y géneros fungosos en general.



Conclusión. Se postula la presencia regional de un síndrome de declinamiento en aguacate asociado a un complejo de hongos caracterizado por defoliación descendente, marchitez, reducción de crecimiento de fruto, decoloración y necrosis medular y cortical en raíz secundaria. Los nectriales *Dactylonectria macrodidyma*, *D. novo-zelandica*, *Thelonectria lucida*, *Mariannaea samuelsii* y *I. liri dendry* se asociaron con estos síntomas posiblemente con capacidad primaria de infección, pero frecuentemente en coinfección con *Fusarium* spp y / o *Armillaria* spp. ($r = 0.60 - 0.88$, $p \leq 0.05$). Otros hongos podrían estar asociados. *Phytophthora* podría tener limitada implicación en este síndrome. Este constituye el primer reporte de *Ilyonectria*, *Dactylonectria*, *Mariannaea* y *Thelonectria* asociados al aguacate (*Persea americana*) en México

Palabras clave: Hypocreales, *Persea americana*, *Ilyonectria*, *Dactylonectria*.

INTRODUCCIÓN

Michoacán aporta 94.6% de la producción nacional de aguacate (*P. americana*). En los últimos 10 años, se ha registrado un incremento de 70712 ha de superficie sembrada de un total de 183385 (SIAP, 2022), de las cuales 142481 (78 %) están certificadas para exportación. Esta superficie se distribuye aproximadamente en 44 mil huertos y 43 municipios (CESAVEMICH, 2022). De estos, Tancítaro posee la mayor superficie sembrada, seguido de Uruapan, Tacámbaro, Salvador Escalante, Ario de Rosales y Peribán (SIAP, 2022). En 2022, Jalisco inició su programa de exportación y certificación de huertos de aguacate para EUA con 12000 ha (SADER, 2022). Esta expansión productiva genera riesgos por movilización de plantas de vivero con nula o limitada certificación fitosanitaria. Entre los potenciales problemas por movilización se incluyen organismos parasíticos asociados a raíz. A nivel comercial se tiene registro de *Phytophthora cinnamomi*, *Rosellinia necatrix*, *Verticillium albo-atrum* y *Armillaria* sp. asociados a enfermedades de raíz (Téliz y Mora, 2007). Recientemente, miembros de la familia Nectriaceae (Ascomycota, Hypocreales) también se han reportado asociados a diversos cultivos agrícolas y forestales en países con clima tropical o subtropical (Mora *et al.*, 2018, Parkinson *et al.*, 2016). En Michoacán, prospecciones recientes han evidenciado la implicación de nectriales con síntomas de marchitez, amarillamiento, defoliación apical y muerte de plántulas en vivero y plantas en huertos recién establecidos (Michua C. J. 2022. No publicado). Estos organismos se han reportado en Sudáfrica, Israel, España, Chile, Italia, Australia y Sudamérica en *Vitis vinifera*, *Rubus glaucus*, *Panax ginseng*, *Prunus dulcis*, *P. avium*, *P. persica*, *Actinidia deliciosa*, *Pistaciavera*, *Olea europaea* y *Juglans regia* (Lawrence *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2015; Cedeño *et al.*, 2004).

La caracterización biológica y molecular con fines taxonómicos de estos hongos es compleja por la variabilidad fenotípica y ausencia de genes constitutivos con viabilidad amplia para discriminar a nivel intra- e inter-género (Androsiuk *et al.*, 2022). Por esta razón, algunos autores utilizan análisis filogenético-concatenados con genes/regiones como TEF *1- α* , HIS, tubulina e ITS, o se emplea el genoma mitocondrial en adición a la caracterización morfológica y estudios de compatibilidad sexual (Androsiuk *et al.*, 2022; Lawrence *et al.*, 2019; Crous *et al.*, 2004). Esta complejidad se denota, por ejemplo,

con *Dactylonectria*, en que a nivel cultural se pueden observar diferencias contrastantes entre aislados, ser sexualmente compatibles y ubicarse en clados filogenéticos distintos (Crous *et al.*, 2004). En otros casos los estudios son escasos e inconclusos como en *Mariannaea* (Lawrence *et al.*, 2019). Un reciente trabajo filogenético con base en 15 genes clasificó a 45 especies Hypocreales en seis clados principales correspondientes a igual número de familias, entre ellas a Nectriaceae. Interesantemente, *Ilyonectria destructor*, perteneciente a esta familia, se encontró fuertemente emparentado con 10 especies de *Fusarium* (Androsiuk *et al.*, 2022).

En Australia se han aislado especies de *Calonectria*, *Gliocladiopsis* sp. y *Neonectria* de raíces sintomáticas de árboles jóvenes de *P. americana* con detrimento productivo o muerte posterior al trasplante. En contraste, en árboles adultos se ha identificado un complejo de especies de *Cylindrocarpon*, *Cylindrocladium* e *Ilyonectria* a partir de raíces secundarias (Dann *et al.*, 2011). En general, la prevalencia de nectriales se ha vinculado con características fisicoquímicas del suelo, principalmente pH, MO, Ca y Fe (Parkinson *et al.*, 2017). Por lo anterior, se planteó la hipótesis de la existencia, independiente o combinado con otros hongos de raíz del aguacate, de un complejo de nectriales con distribución endémica y baja prevalencia en Michoacán promovida por el gradual deterioro de salud del suelo; cambio abrupto de áreas forestales a cultivación de aguacate; y alteración del régimen hídrico. Consecuentemente, el objetivo de este trabajo fue caracterizar biológica y/o molecularmente especies de nectriales y otros hongos asociados a pudrición de raíz de *P. americana* en huertos comerciales provenientes de condiciones geográficas contrastantes de la franja aguacatera de Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de árboles y aislamiento. En 2019 y 2022, 39 huertos de 13 municipios de la franja aguacatera árboles fueron muestreados para diagnóstico etiológico. Se seleccionaron árboles con síntomas de marchitez, amarillamiento, defoliación, y reducción de crecimiento de fruto. La muestra consistió en trozos de raíces secundarias las cuales exhibieron coloraciones rojizas en tejido central pero no en epidermis y necrosis medular con diferente intensidad. Por huerto se tomaron de 2 - 6 muestras compuestas. Adicionalmente, por árbol muestreado se evaluó el daño en dosel con una escala de 5 clases donde 0 = aparentemente sano, 1 = 25 % de dosel sintomático, 2 = 50 %, 3 = 75 % y 4 = árbol muerto. Adicionalmente, se registró fotográficamente cada árbol y raíces muestreadas para generar una escala nominal de severidad específica a nectriales una vez identificados los hongos presentes. Por huerto, se calculó el promedio de daño en dosel para su integración a un análisis geoestadístico regional. Los aislados fungosos se obtuvieron de 10 segmentos (0.5 – 1 cm) de raíz de 1 - 2 cm de diámetro. La desinfestación consistió en inmersión en hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min; enjuague en agua destilada estéril seguida de sumersión en solución de etanol al 70 % durante 1 min y lavado final con agua destilada estéril. Las raíces desinfestadas se sembraron en placas Petri (9 mm) con Extracto de Malta Agar (EMA) (2 %) con adición de estreptomycin (0.250 g L⁻¹). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante siete días con exposiciones a luz ultravioleta a intervalos de 30 min. Todos los aislados fueron purificados mediante cultivos monospóricos en tres medios de cultivo EMA, Papa

Dextrosa Agar (PDA) y Avena Agar (AA). En total, se seleccionaron 30 aislados nectriales mediante criterios culturales, representatividad regional, y tipología agronómica de huertos para caracterización genómica (Cuadro 1). Adicionalmente, aislados de *Fusarium*, *Armillaria* y *Phytophthora cinnamomi* fueron purificados y caracterizados a nivel de género o especie para estudios de potencial asociatividad patogénica (Michua-Cedillo *et al.*, 2024; López-Bautista *et al.* 2020;). Todo el acervo biológico se mantiene en conservación *in vitro* en condiciones de laboratorio.

Cuadro 1. Origen de aislados de nectriales asociados a árboles de aguacate seleccionados para extracción de ADN y PCR-amplificación con TEF *1-α* y RPB2.

ID	Huerto	Municipio	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Variedad ^x	Severidad ^y	Aislado	Injerto
Mich 03	PA	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 09	SM	Pátzcuaro	19.27300	-101.42420	2288	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 11	SM	Pátzcuaro.	19.27302	-101.42422	2288	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 12	SM	Pátzcuaro	19.27303	-101.42423	2288	Hass	3	Raíz	Criollo
Mich 14	PA	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 15	SM	Pátzcuaro	19.27300	-101.42420	2288	Hass	3	Raíz	Criollo
Mich 16	SM	Pátzcuaro	19.27300	-101.42420	2288	Hass	3	Raíz	Criollo
Mich 24	G	Uruapan	19.30260	-102.02530	2111	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 25	G	Uruapan	19.30260	-102.02530	2111	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 26	Q	Tingüindin	19.68777	-102.44619	1747	H, M,FM	2	Raíz	Criollo
Mich 34	PA 1	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 35	PA 2	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 36	PA 3	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 37	PA 4	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 39	PA 6	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 40	PA 7	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 41	PA 8	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 44	PA 5	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 45	G1	Uruapan	19.39360	-102.20520	2050	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 46	H18	Uruapan	19.27010	-102.0040	1781	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 51	PA 9	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 52	PA 10	Ario de R.	19.16470	-101.42140	1483	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 53	EIC 32	Salvador E.	19.19450	-101.41260	2157	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 54	LaC	Uruapan	19.56342	-102.34829	2045	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 55	LaR	Salvador E.	19.20210	-101.41490	1379	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 57	LaC	Uruapan	19.56344	-102.34829	2045	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 59	LaPP	Tancítaro	19.42310	-102.46702	2148	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 64	Y	Tancítaro	19.35525	-102.36393	2148	Hass	1	Raíz	Criollo
Mich 66	EIT12	Tancítaro	19.42399	-102.40619	2145	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 67	EIZ	Charapan	19.64823	-102.25045	2829	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 68	EIB	Tancítaro	19.42309	-102.46702	1711	Hass	2	Raíz	Criollo
Mich 69	AF	Peribán	19.32260	-102.24040	1487	H, M	2	Raíz	Criollo
Mich 70	Z	Uruapan	19.54065	-102.34328	1944	Hass	2	Raíz	Criollo

^xVariedad: H=Hass; M= Méndez; FM= Flor de María; ^ySeveridad en escala nominal de 0 = aparentemente sano a 4 = muerto.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación. El micelio se obtuvo a partir de aislados monospóricos sembrados en EMA durante 10 días y transferidos a medio líquido PD para la extracción con micelio deshidratado. La extracción de ADN se realizó con el protocolo de AP (SDS 1 %) (Sambrook y Russell, 2001). Para amplificación por PCR, la concentración se ajustó a 40 ng μL^{-1} . El protocolo de PCR para TEF *1- α* y RPB2 fue el adaptado por CP-LANREF (López-Bautista *et al.* 2020). Los iniciadores fueron EF1 (5'–ATG GGT AAG GAR GAV AAG AC) y EF2 (5'–GGA DGT ACC AGT RAT CAT G) para TEF *1- α* ; y 5F2 (5' – CTG GGG HGA YCA RAA RAA RGC) y 7cR (5' – CCA TRG CYT GYT TRC CCA TRG C) para RPB2 (Lombard *et al.*, 2015). Las amplificaciones se realizaron en termociclador T-100 de BioRad. El programa PCR para TEF *1- α* consistió en: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min y 30 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 58 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 55 s y una extensión final de 72 °C por 7 min (Mendoza *et al.* 2021). Para RPB2 las condiciones de PCR fueron 94 °C por 90 s, seguido por 40 ciclos a 94 °C por 30 s, a 61 °C por 90 s y a 68 °C por 2 min y una extensión final a 68 °C por 5 min (López-Bautista *et al.*, 2020). Los fragmentos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a 90 volts por 90 min. Los productos de PCR se enviaron a MacroGen Inc., South Korea para su secuenciación.

Análisis filogenético. Las secuencias obtenidas se editaron con el software SeqAssem (v07/2008) eliminando ambigüedades en los extremos. Se analizaron con la función BLASTn en NCBI para identificación de especies tomando como base el porcentaje de identidad. Inicialmente se incluyeron secuencias con porcentaje de identidad mayor a 98 % respecto a los aislamientos tipo y a secuencias de especies asociadas a nectriales publicadas por Lombard *et al.* (2015) y Lawrence *et al.* (2019) ($n = 66$ para RPB2; $n = 65$ para TEF *1- α*) y disponibles en NCBI. Posteriormente se incluyeron otras con homologías > 94 % que conformaron clados con especies ya reportadas. Esto debido a la variabilidad de nectriales (Androsiuk *et al.*, 2022). Se realizó el alineamiento de secuencias empleando el servidor MAFFT ver 4.0 configurado con los parámetros predefinidos (Kato *et al.*, 2017). El archivo en formato FASTA obtenido del alineamiento se convirtió a extensión NEXUS con el software Mesquite v. 3.10 (Parkinson *et al.* 2017). Para cada gen / región se realizó el análisis filogenético utilizando el criterio máxima parsimonia con el software PAUP ver 4.0. Se utilizaron *Stachybotrys chartarum*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. circinatum*, *Nectria cinnabarina*, *N. rubicola*, y *N. balansae* como especies externas, las cuales fueron seleccionadas por su asociación con árboles de aguacate, especies forestales o uso en estudios filogenéticos previos (Lombard *et al.*, 2015). El análisis de inferencia Bayesiana se generó en MrBayes v. 3.2.5 con Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Los árboles filogenéticos se visualizaron y editaron empleando los softwares FigTree v1.4.2 e iTOL: Interactive Tree Of Life.

Análisis de distribución geográfica. En ArcMap® v10.3, una matriz de frecuencias, agrupada por sitio de muestreo, a nivel de género y especies de nectriales, y de otros hongos y pseudohongos aislados de raíz, se importó y visualizó mediante *Pie chart* para determinar la ocurrencia y co-ocurrencia regional. Adicionalmente, un mapa interpolado mediante IDW2 con la severidad promedio en dosel de árbol por sitio se usó como referencia para determinar la asociatividad de nectriales, y otros hongos y pseudohongos con potencial inductividad epidémica.

Asociatividad de especies de nectriales con otros hongos y pseudohongos. En RStudio® 2023.06.2, la matriz de frecuencias a nivel de género y especies de nectriales, y otros hongos y pseudohongos, se ajustó a un análisis de correlación de Pearson (r) mediante la función *cor* (librería *Base*). La visualización de la correlación se realizó mediante la función *corrplot* (librería *Corrplot*). Adicionalmente, las 25 correlaciones de mayor asociatividad y significancia (p -value < 0.05) se visualizaron mediante la función *cross-correlation* (librería *lares*). Este análisis tuvo como propósito demostrar la asociatividad potencialmente patogénica entre especies de hongos y pseudohongos con los síntomas previamente descritos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sintomatología. Los síntomas identificados en campo asociados a nectriales consistieron en una marchitez generalizada de intensidad variable; defoliación descendente progresiva a partir de ramas apicales superiores; y reducción del crecimiento de fruto. En raíces secundarias, inicialmente se forman lesiones rojizas subcorticales, seguido de lesiones necróticas invasivas en médula y eventualmente subcorticales con formación de pequeñas protuberancias en árboles con severidad 75 – 100 % (Figuras 1 y 2). Se generó una escala nominal de severidad de seis clases específica para nectriales, i.e. a partir de aquellos árboles sin detección de otros organismos con efectos sintomatológicos análogos. Las clases propuestas incluyeron daño en dosel y raíz pudiéndose encontrar árboles severamente defoliados y necrosis invasiva cortical - medular con deformación en raíz secundaria, pero no muerte de árbol. Aunque se observó alta variabilidad en intensidad de lesión en raíz, necrosis en xilema y floema primario y secundario, fue la condición predominante (clase 4) (Figura 2). Sin embargo, debido a la presencia en Michoacán (Michua-Cedillo *et al.*, 2024; Olalde-Lira *et al.*, 2020; Rivas-Valencia *et al.*, 2017), también confirmados en este trabajo, de *Armillaria*, *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium* y *Verticillium*, los cuales pueden causar síntomas similares, para una correcta identificación de síntomas de nectriales es fundamental complementar con diagnósticos de laboratorio (Figura 1). Adicionalmente, prospecciones de campo con base en síntomas pueden ser complejas e imprecisas debido a síntomas inconsistentes entre especies nectriales y la frecuente asociación entre estos, y los otros organismos reportados en este trabajo (Figura 2). Aunque restrictivo para proyectar el efecto patogénico en árboles adultos (> 10 años) (Olalde-Lira *et al.*, 2020; Parkinson *et al.*, 2017; Dann *et al.*, 2011), condición en la que predominantemente se han detectado síntomas de nectriales, trabajos de patogenicidad adicionales son necesarios para comprender efectos individuales y combinados de estos organismos en sintomatología y fisiología de planta.

Cuadro 2. Características fisicoquímicas de algunos huertos de aguacate muestreados y especies de nectriales identificados.

Municipio / Huerto	pH	MO	Ca	Fe	CE	Especies Nectriales / ID
Ario de Rosales / PA	5.8	7.6	725	11.3	0.6	<i>I. liriodendri</i> (Mich03, Mich35, Mich36, Mich40, Mich44, Mich52) <i>D. macrodidyma</i> (Mich41) <i>D. novozelandica</i> (Mich34, Mich37, Mich39, Mich51) <i>M. samuelsii</i> (Mich14)
Pátzcuaro / SM	6.0	7.7	1139.6	21.9	0.6	<i>I. liriodendri</i> (Mich09, Mich10, Mich11, Mich12, Mich13, Mich15, Mich16)
Uruapan / G1	6.2	5.0	1285.2	67.8	0.3	<i>I. liriodendri</i> (Mich45)
Salvador E. / EIC32	6.4	6.4	1275.1	22.9	0.4	<i>D. novozelandica</i> (Mich53)
Uruapan / LaC	6.3	3.6	2104.8	25.5	1.3	<i>I. liriodendri</i> (Mich54) <i>T. lucida</i> (Mich57) <i>D. macrodidyma</i> (Mich58)
Tancítaro / EIT12	6.1	4.1	988.5	14.9	0.09	<i>I. liriodendri</i> (Mich66)
Charapan / EIZ	5.9	5.3	576.7	22	0.1	<i>I. liriodendri</i> (Mich67)
Tancítaro / EIB	5.7	2.6	1433	16	0.5	<i>I. liriodendri</i> (Mich68)
Uruapan / Z	6.4	1.5	1382.2	20.8	0.2	<i>D. macrodidyma</i> (Mich70)

La presencia de nectriales aparentemente se asoció con huertos con pH 5.8 - 6.4, independientemente del nivel de MO, Ca, Fe y CE. Previos reportes han relacionado mayor necrosis en raíces secundarias en suelos con pH > 5, en comparación con pH \geq 7.0 (Rahman y Punja, 2005). Esta tendencia también se ha observado en otros hipocreales, como *Fusarium* spp., los cuales pueden exhibir mayor severidad de síntomas de marchitez (Lopez-Bautista *et al.*, 2020). Adicionalmente, en aguacate se ha demostrado que el contenido de humedad es un factor determinante en la presencia o ausencia de estos organismos. En condiciones de estrés hídrico la frecuencia de nectriales es mayor comparado con humedad > 40 %, debido a disminución en carga de inóculo (Agustí y Armengol, 2013). Posiblemente, la prevalencia e incidencia de nectriales, considerados en general de baja agresividad (Lombar) y otros organismos asociados puede explicarse por la expansión del cultivo de aguacate en Michoacán hacia zonas de transición climática de templado a cálido (p.e. Ario de Rosales: (A)C(w2) (w)a(e), *sensu* Enriqueta García), y la creciente conversión de áreas forestales con implicación en cambio de régimen hídrico detrimental.

Morfotipos culturales. Se observaron cinco morfotipos en EMA, PDA y AA, diferenciados por color de micelio, crecimiento y pigmentación. Los aislados presentaron crecimiento lento (10-15 días) con crecimiento radial uniforme o irregular fimbriado; micelio algodonoso - aéreo o deprimido; pigmentación combinada en amarillo, blanco cremoso o marrón; y presencia de macroconidios hialinos, o ligeramente pigmentados, 0-4 septos, cilíndricos rectos con extremos redondeados o ligeramente en punta, y microconidios unicelulares (Figura 3). Estas características en general coinciden con descripciones de la familia Nectricaceae (Lombard *et al.*, 2015). El medio de cultivo EMA, seguido de AA permitió la mejor caracterización. Estos morfotipos correspondieron a las especies *Dactylonectria macrodidyma*, *D. novozelandica*, *Ilyonectria liriodendri*, *Mariannaea samuelsii* y *Thelonectria lucida* (ver sección Análisis Filogenético).



Figure 1. **A.** Árbol aparentemente sano y corte longitudinal y transversal de raíz de 1.5 cm de diámetro y asociación de *Ilyonectria liriodendri*; **B.** Defoliación apical, corte longitudinal y transversal de raíz con necrosis restringida asociados a *I. liriodendri*; **C.** Reducción del tamaño de frutos, corte longitudinal y transversal de raíz con necrosis invasiva asociada a *I. liriodendri*; **D.** Defoliación y hoja pequeña asociada a *Armillaria* + *I. liriodendri* y raíz con necrosis medular; **E.** marchitez moderada asociada a *Phytophthora cinnamomi* + *I. liriodendri* y corte longitudinal de raíz con necrosis restringida; **F.** Follaje amarillo, hoja pequeña y reducción de copa asociado a *Fusarium* spp + *Dactylonectria macrodidyma* y raíz con necrosis medular invasiva. **G.** Marchitez progresiva y raíz con necrosis y micelio invasivo en raíz de raíz asociado a *Armillaria* sp.; **H.** Marchitez, amarillamiento de follaje y raíz con necrosis subcortical asociada a *Phytophthora cinnamomi*; **I.** Marchitez general, follaje necrótico adherido a ramas, raíz con líneas de necrosis en raíz vascular asociado a *Verticillium* sp.

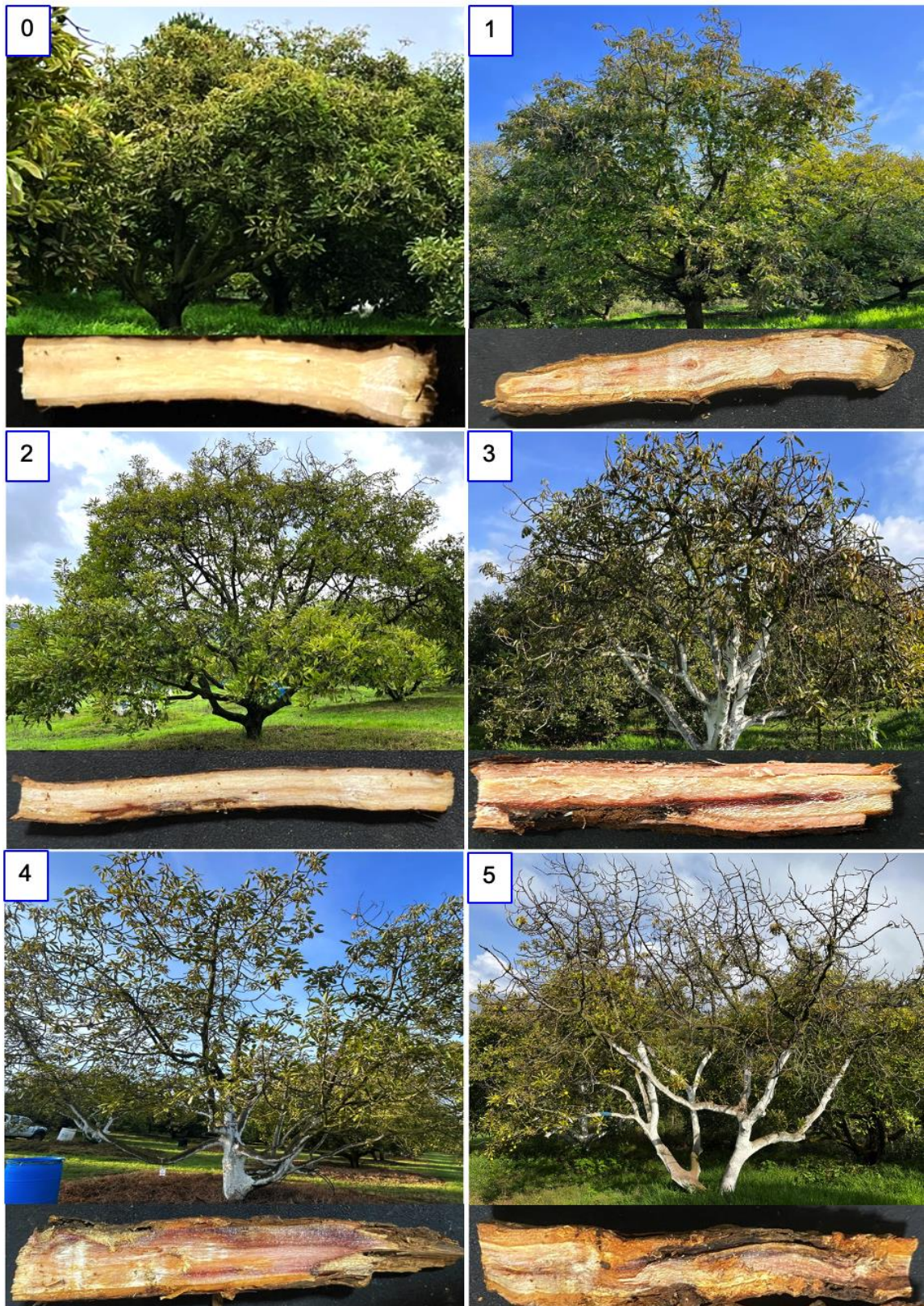


Figura 2. Escala nominal de seis clases de vigor y daño raíces secundarias de aguacate asociados a cuatro géneros y cinco especies de nectriales: **0.** Árbol sano con 100% de vigor y raíz sin lesiones; **1.** Defoliación apical en ramas superiores, raíz con lesiones rojizas <1 cm en raíz central (80% vigor en copa); **2.** Defoliación apical progresiva en ramas superiores, amarillamiento en estrato foliar inferior, raíz con líneas rojizas en parénquima medular (75% vigor); **3.** Defoliación, marchitez y raíz con necrosis invasiva en raíz subcortical y medular (50% vigor); **4.** Defoliación parcial, hojas pequeñas y raíz con necrosis en xilema y floema primario y secundario raíz (35% vigor); y **5.** Árbol defoliado y raíz con necrosis invasiva (15% vigor).

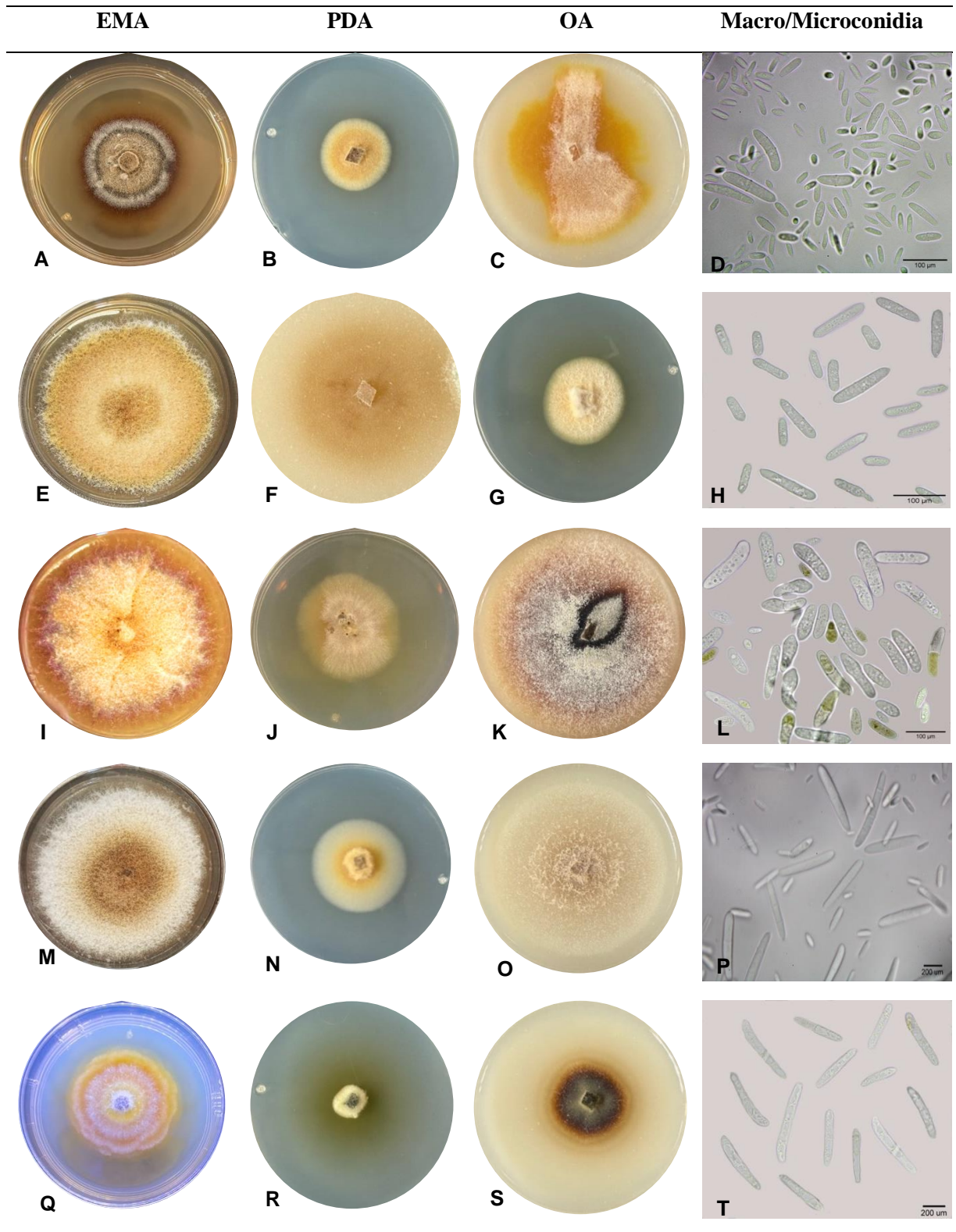


Figura 3. Morfotipos culturales de nectrias aislados de raíces de aguacate con síntomas en dosel y raíces según descripción en Figura 2 e identificados molecularmente con homología > 97% para la región/gen RPB2 y TEF 1- α . **A-D.** *Dactylonectria macrodidyma*; **E-H.** *Dactylonectria novozelandica*; **I-L.** *Ilyonectria liriiodendri*; **M-P.** *Mariannaea samuelsii*; y **Q-T.** *Thelonectria lucida*.

Se observaron algunas similitudes entre macroconidios de *Ilyonectria* y *Dactylonectria*, no obstante, no es una variable robusta para discriminar entre estos

géneros. *Mariannaea* presentó macroconidios con 1-2 septos, pared celular gruesa y extremos con terminación ligeramente en punta. *Thelonectria* fue el único género que presentó crecimiento miceliar anillado cremoso amarillo en EMA o coloración marrón en AA después de 15 días de crecimiento. Petit y Gubler (2005) indicaron que, aunque los conidios de *D. macrodidyma* son más grandes que los de *I. destructans*, no son significativamente diferentes, por lo que determinaron que el análisis molecular es necesario para obtener un diagnóstico confirmatorio a nivel especie comparando *Dactylonectria* e *Ilyonectria*. La morfología de colonia y atributos de conidios se han utilizado ampliamente para delimitar especies miembros de Nectriaceae (Schroers *et al.* 2008). Sin embargo, este enfoque requiere alta especialización y experiencia taxonómica. En vid, se han observado diferencias culturales y conidiales entre una colección de aislados de *Neonectria liriodendri* obtenidos de plantas asintomáticas y sintomáticas (Halleen *et al.* 2004). Aunque en este estudio los morfotipos fueron aislados de árboles predominantemente sintomáticos, se sugiere procesar raíces de árboles asintomáticos para discriminar diferencias morfológicas. En general, en los cuatro géneros se observó presencia de macro y microconidios, presencia de vesículas y clamidosporas en cadena o solitarias. Particularmente, *Ilyonectria* presentó macroconidios cilíndricos con 1-4 septos, microconidios aseptados, elípticos y clamidosporas globosas a subglobosas con micelio hialino, similares a estudios análogos en California (Lawrence *et al.*, 2019). Estas características fueron observadas en 17 cepas aisladas de raíz de aguacate. Los macroconidios de *Dactylonectria* fueron cilíndricos, hialinos, rectos a ligeramente curvados, 1-4 septos, microconidios elipsoides a ovoides, hialinos, 0 – 1 septo, con hilio diminuto. Las clamidosporas globosas a subglobosas formadas en cadenas. En *Thelonectria* se observaron macroconidios septados, curvos, a menudo más anchos en el tercio superior, con células apicales redondeadas y células basales aplanadas o redondeadas con hilio discreto y clamidosporas solitarias. *Mariannaea* posee macronidios con 1-2 septos, hialinos, clamidosporas de globosas a elipsoidales, hialinas, formadas en cadenas intercalares. Las características de estos géneros en general concuerdan con reportes previos (Lombard *et al.* 2015). Adicionalmente, se aislaron dos especies de *Armillaria*, tres de *Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani* y *Fusarium* sp.) y de *Phytophthora cinnamomi* (Figura 4). También se detectó en menor frecuencia a *Mortierella* sp., *Paecilomyces* sp., *Acremonium* sp. y *Acrostalagmus* sp., los cuales mostraron asociatividad con algunos síntomas descritos, combinados o no, con las especies nectriales identificadas.

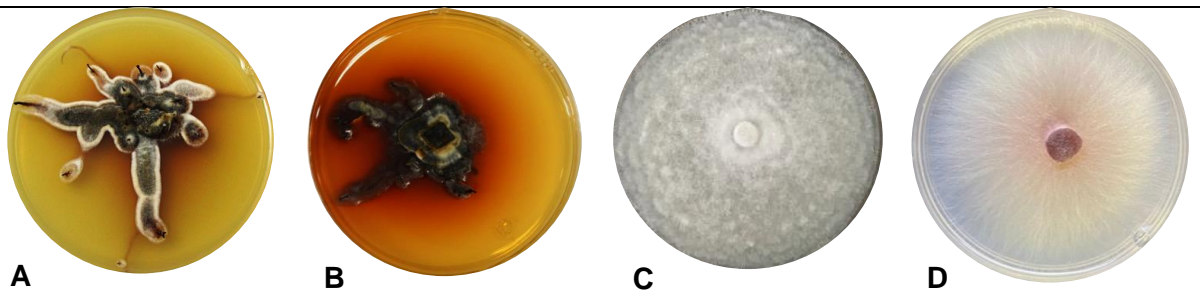


Figura 4. Morfotipos culturales en EMA al 2% (A, B) y PDA (C, D) aislados de raíces de aguacate con síntomas putativos a nectriales. A. *Armillaria* sp.; B. *Armillaria gallica*; C. *Phytophthora cinnamomi*; y D. *Fusarium* sp.

Identificación y análisis filogenético. Se obtuvieron amplicones de aproximadamente 900 y 600 pb, asociados a RPB2 y TEF *1- α* , respectivamente, para todos los aislados (Cuadro 1). El análisis de máximo parsimonia e inferencia Bayesiana coincidieron en la conformación de clados para los 30 aislados. Con RPB2 se identificaron cuatro géneros y cinco especies con homología ≥ 97 %: *Dactylonectria macrodidyma*, *D. novozelandica*, *Ilyonectria liriodendri*, *Mariannaea samuelsii* y *Thelonectria lucida*. TEF *1- α* permitió identificar a *D. macrodidyma* y *I. liriodendri* con homología ≥ 97 %. Mientras que *M. catenulata* tuvo una homología de 64 % considerado muy bajo para una identificación taxonómica. Las secuencias de nucleótidos se registraron en el GenBank de NCBI con los siguientes números de acceso: *I. liriodendri* (Mich 3, OR593990; Mich 9, OR593991; Mich 11, OR593992; Mich15, OR593993; Mich 26, OR593994; *T. lucida* (Mich 57, OR607642); y *M. samuelsii* (Mich 14, OR593995; Mich 24, OR593996).

La estructura filogenética conformó cuatro clados principales con RPB2 de los cuales el específico al género *Ilyonectria* fue el de mayor prevalencia seguido del *Dactylonectria*, *Mariannaea*, *Thelonectria* y un aislado que no conformó clado con una especie(s) nectrial (MICH59) (Figura 5). Con TEF *1- α* se conformaron tres clados (Figura 6). Las filogenias individuales por gen / región con el algoritmo de inferencia Bayesiana mostraron resolución baja a moderada con definición de clados interespecíficos. Con RPB2 esto fue evidente para *Dactylonectria*, *Mariannaea* y *Thelonectria* (Figura 5). Para el género *Ilyonectria*, TEF *1- α* y RPB2, conformaron clados principales definidos con *I. liriodendri*, mientras que *I. robusta* e *I. destructans* conformaron subclados. Los porcentajes de similitud y cobertura con secuencias del BLAST fueron entre 97 y 100% respectivamente. Con TEF *1- α* , las cepas MICH3, MICH9, MICH11 y MICH12 se agruparon con *I. liriodendri*, mientras que con RPB2 se integraron 14 aislados dentro del clado pero con distancias entre 0.022 y 0.043, lo que sugieren la presencia de haplotipos o alta variabilidad intraespecífica.

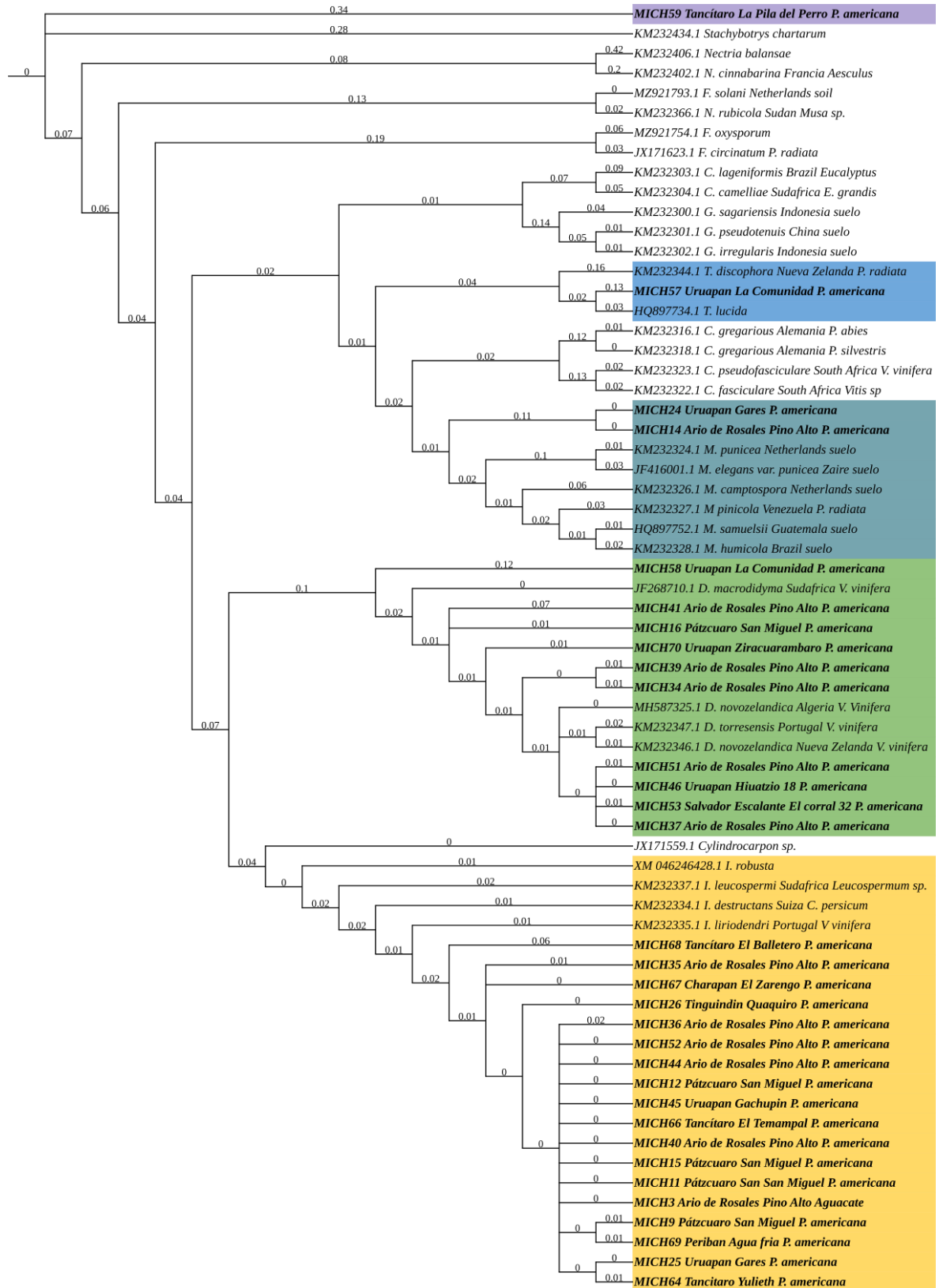


Figura 5. Árbol filogenético generado por análisis de Inferencia bayesiana de secuencias de la región RPB2 generados a partir de aislados de nectriales de árboles de aguacate comercial. Los aislados provenientes de este trabajo están indicadas con el prefijo MICH. El análisis incluyó ocho especies de referencia externa (ramas superiores y *Cylindrocarpon*). La barra de escala representa el número esperado de cambios de nucleótidos por sitio.

La estructura filogenética con máxima parsimonia y RPB2 mostró que el aislado MICH16 se integró con *D. novo-zelandica* mientras que inferencia Bayesiana se agrupó con *D. macrodidyma* (Figura 6). Los dos algoritmos empleados colocaron en similar clado a MICH14 con varias especies de *Mariannaea*. La cepa MICH57 estuvo emparentada con *Thelonectria lucida*, siendo la única que representó a este clado. En contraste, el aislado MICH59 no estuvo agrupado en ningún clado, incluso quedó fuera de las especies referencia, las cuales claramente quedaron fuera de la estructura filogenética que conformaron la mayoría de los aislados de aguacate.

Regiones parciales o completas de los genes ITS, TEF *1- α* , TUB e HIS, se han utilizado ampliamente en análisis filogenéticos moleculares de ascomicetos. Sin embargo, en la familia Nectriaceae se han observado discrepancias analíticas filogenéticas al emplear secuencias integradas por algunos genes, en particular la identificación precisa de *Dactylonectria* spp. (Lawrence *et al.* 2019). Se ha demostrado que el locus HIS es un marcador idóneo para la delimitar especies con alta proximidad a *Cylindrocarpon* (Cabral *et al.*, 2012a). Este gen taxonómicamente ha resuelto a *D. macrodidyma* (Gordillo *et al.*, 2017). Sin embargo, la selección de regiones genómicas debe estar basada en el número de sitios informativos y conservados para obtener un porcentaje útil de la secuencia. Los genes TEF *1- α* y RPB2 poseen un porcentaje informativo de 81 % y 64 %, y número de sitios invariables de 94 % y 48 %, respectivamente (Lombard *et al.* 2015). Sin embargo, en esta investigación RPB2 resultó más efectivo para la identificación taxonómica y generó una estructura filogenética más consistente para discriminar los aislados entre géneros nectriales. Adicionalmente, la inferencia Bayesiana mostró mayor consistencia filogenética. Los géneros *Cylindrocladiella*, *Cylindrocladium*, *Dactylonectria*, *Gliocladiopsis*, *Ilyonectria* y *Mariannaea* se han reportado en *P. americana* usando ITS, HIS y TUB con análisis concatenado de secuencias; además, los genes hibridizados han sido eficientes para identificar *Ilyonectria* y *Dactylonectria* (Parkinson *et al.*, 2017). Contrariamente, *Thelonectria* y *Mariannaea* han sido poco estudiados, y en particular *Mariannaea* no es un patógeno frecuente en cultivos de importancia económica (Hu *et al.* 2016). Considerando que las secuencias de las especies de *Mariannaea* utilizadas en este análisis filogenético provienen de rizosfera y de raíz con síntomas de necrosis, sugiere que los aislados identificados dentro de este género podrían ser parásitos facultativos o saprófitos. Este género se ha encontrado en una amplia gama de hospedantes perennes en California (Rosman *et al.* 2016). Asimismo, se ha documentado que el uso acotado a dos genes no tiene precisión para algunas especies como *T. aurea*, sin embargo, la concatenación o análisis multilocus permite separar discriminar linajes de nectriales en general (Lawrence *et al.*, 2019; Lombard *et al.*, 2015). En este trabajo se optó por realizar en una primera etapa estudios filogenéticos independientes con el fin de priorizar la capacidad informativa de cada gen / región. Estudios futuros deben integrar otros genes con el fin de encontrar los análisis multilocus más pertinentes (Lombard *et al.*, 2015).

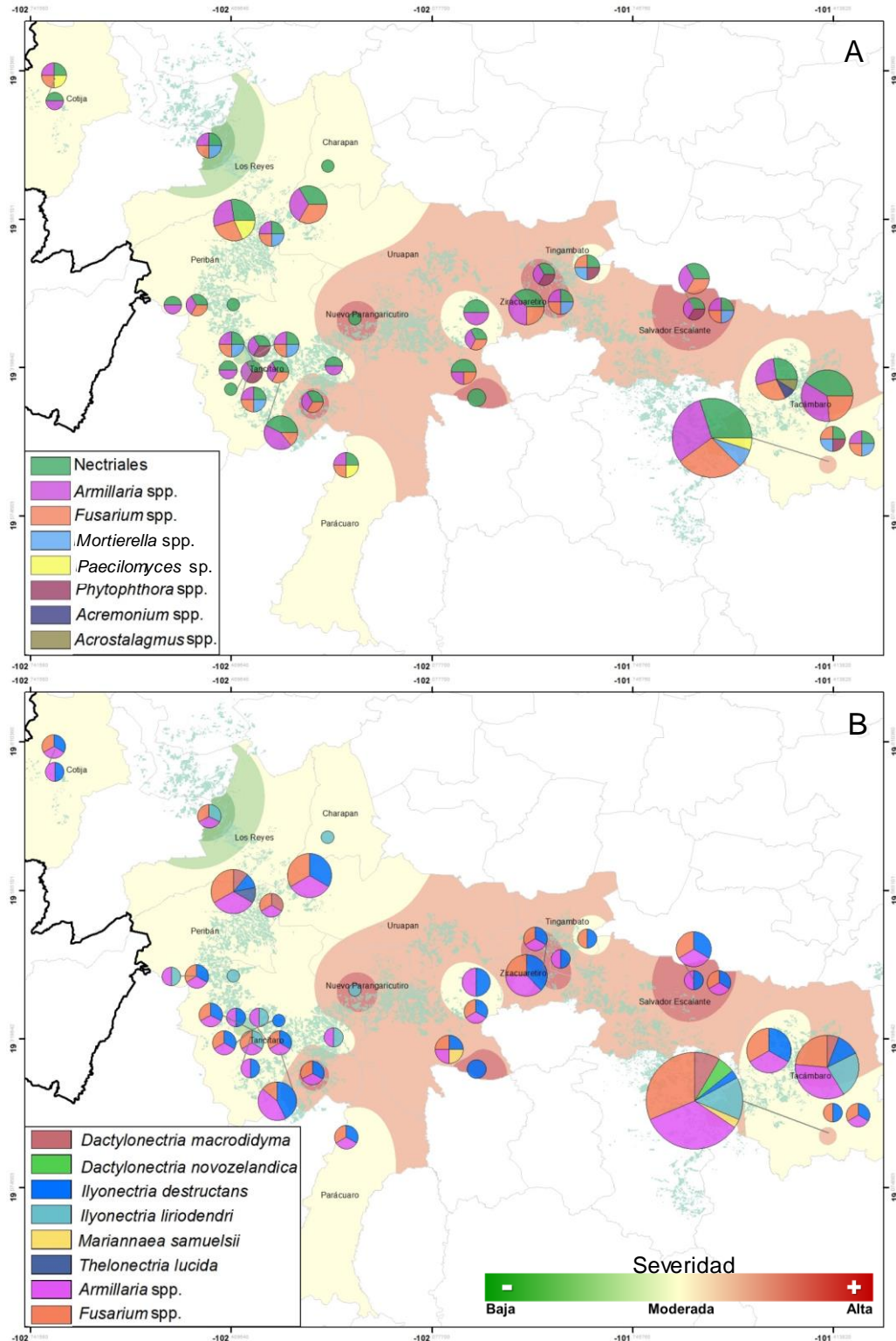


Figura 7. Distribución y prevalencia regional de comunidades en raíz de organismos putativamente asociados con el decaimiento y síndrome de marchitez del aguacate en 13 municipios de Michoacán. **A.** Distribución filogeográfica de cuatro géneros nectriales. **B.** Distribución filogeográfica de seis especies nectriales. Se incluyen *Armillaria* spp. y *Fusarium* spp. como especies de alta prevalencia regional (fines comparativos). Las zonas verde-amarillo-marrón en ambos mapas muestra la proyección geoestadística de intensidad epidémica (escala de color: baja, moderada y alta) evaluada mediante escala de severidad de daño en dosel de árbol. El punteado color azul verdoso representa polígonos del inventario de huertas de aguacate.

Análisis geográfico y asociatividad entre organismos. A nivel regional, al menos una especie nectrial se encontró en 100 % de sitios y municipios muestreados y en co-ocurrencia alta con *Armillaria* spp (97.1 %), *Fusarium* spp. (92.9 %) ($r = 0.60 - 0.88$, $p \leq 0.05$) (Figura 1D y 1F), y moderada con *Mortierella* spp. (47.3 %) y *Paecilomyces* spp. (56.4 %) ($r = 0.41 - 0.63$, $p \leq 0.05$), con el resto de los géneros no se encontró co-ocurrencia significativa, incluido *Phytophthora cinnamomi* a pesar de antecedentes regionales causando marchitez en árboles de aguacate ($r = -0.19 - 0.0$) (Figura 1H; Figura 7A, Figura 8A) (Teliz y Mora, 2007). En general, *Armillaria* spp. y *Fusarium* spp. fueron las especies más ampliamente distribuidas y con mayor co-ocurrencia y asociatividad ($r = 0.94$, Figura 7A y Figura 8A y 8B). La asociatividad infecciosa de *Armillaria* spp. con *Fusarium oxysporum*, se ha reportado en Michoacán causando muerte descendente de *Prunus* sp. (Rivas-Valencia *et al.*, 2017). La especie *A. gallica* está consignada en aguacate (Michua-Cedillo *et al.*, 2024). Esta especie, y otra por determinar, se confirmaron en este trabajo. *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, encontradas en esta investigación, han sido previamente reportadas en este cultivo y región (Olalde-Lira *et al.*, 2020). Interesantemente, en sitios donde no se encontraron especies nectriales, p.e., Charapan, Tancítaro y Nuevo Parangaricutiro, *Armillaria* spp fue el hongo predominante relacionado con áreas regionales con inductividad potencialmente epidémica moderada - alta (Figura 1G; Figura 7A). En general, la asociación de *Armillaria* spp., *Fusarium* spp. y nectriales implicó regiones con inductividad de daño regional alta (severidad en planta > 50 %). Interesantemente, en áreas de inductividad epidémica baja - moderada, estos géneros tuvieron co-ocurrencia moderada ($r = 0.49 - 0.65$) con *Mortierella* spp. (Figura 7A, Figura 8A). Las proyecciones espaciales se generaron con escalas de daño en copa y pueden ser un indicativo de endemicidad y de riesgo epidémico que representa el complejo de organismos asociados con síntomas de raíz y copa descritos (Figura 1 y 2). Los datos de este estudio sugieren que el riesgo actual es moderado y requieren intervención regional preventiva.

De 30 aislados procesados para caracterización morfológica y molecular, el 56 % fueron identificados como *I. liriodendri* en Ario de Rosales, Charapan, Peribán, Tancítaro, Tingüindín y Uruapan en huertos de 10 - 40 años, suelo con textura franco-arenosa e interesantemente, una región con nivel de inductividad potencialmente epidémica baja - moderada (Figura 7B). Estas características sugieren que este género podría ser el ancestro de las especies encontradas a nivel regional, y que los aislados dentro del clado pueden ser haplotipos que ha experimentado evolución histórica, lo cual explica su mayor prevalencia regional (adaptabilidad) y nivel de inductividad baja - moderada. Adicionalmente, esta especie se asoció significativamente con *Armillaria* spp. ($r = 0.76$, Figura 8A - 8B). Sin embargo, otro subclado de aislados de *I. liriodendri* estuvo vinculado regionalmente con niveles de inductividad alta en asociación moderada con *Fusarium* spp. y *Armillaria* spp. ($r = 0.28$ y 0.34 , respectivamente), sugiriendo un potencial efecto sinérgico vinculado con daños más severos en dosel - raíz (Figura 7B, Figura 8A - 8B). *Dactylonectria macrodidyma* y *Dactylonectria novozelandica* representaron el 33 % de especies principalmente en Tacámbaro y Peribán, asociadas con *Fusarium* spp. y *Armillaria* spp. ($r = 0.83 - 0.88$, Figura 8A - 8B). *Mariannaea samuelsii* (6 %) y *Thelonectria lucida* (3 %) se identificaron de forma local en Nuevo Parangaricutiro, Tacámbaro y Peribán (Figura 7 - 8). En particular, *Mariannaea samuelsii* tuvo una co-ocurrencia regional moderada con *Armillaria* spp., *Fusarium* spp., *Mortierella* spp., y *Paecilomyces* spp. (Figura 7A y 8A-8B). Los resultados sugieren que

la prevalencia, distribución y diversidad de especies está relacionada con variables fisicoquímicas de suelo, zonas productivas de transición aguacatera, y estrés abiótico, las cuales alguna potencialmente pueden condicionar el potencial virulento de organismos como *Mariannea* spp. que se reporta ampliamente como saprófito (Hu *et al.* 2016).

En general, la mayor diversidad de especies se observó en Uruapan y Tacámbaro (Figura 7 y 8), considerados como pioneros en la producción de aguacate en la región, por lo cual se esperaría encontrar menor diversidad de especies como consecuencia del manejo intensivo del cultivo, en comparación con huertos de Charapan que están establecidos en zonas forestales y son huertos relativamente jóvenes (menores de 15 años). En este municipio, la incidencia de *Armillaria* spp. fue mayor al 90 %, vinculado con conversión de zonas forestales a aguacateras con alta capacidad patogénica y saprófita de este basidiomyceto. La asociatividad de organismos puede generar una expresión de síntomas diversos en dosel y raíz en función del efecto parasitismo de cada especie implicada (López-Bautista *et al.* 2019). En campo, para la asociación *Armillaria* - *Ilyonectria* los síntomas se observaron en árboles longevos con declinamiento lento comparado con árboles de menores a 15 años, donde los síntomas fueron atenuados particularmente en temporada de lluvias. Sin embargo, se sugiere muestreos regionales complementarios para evaluar la correlación de variables de incidencia, severidad, prevalencia, densidad de inóculo de especies identificadas en este estudio y otras con potencial patogénico. Debido a la endemidad y asociatividad diferenciada de especies de nectriales con otros hongos, de los cuales ya se ha demostrado su patogenicidad (Olalde-Lira *et al.*, 2020; Parkinson *et al.*, 2017; Dann *et al.*, 2011), en este trabajo se postula el término ‘*síndrome de declinamiento del aguacate*’ para referirse a un complejo de síntomas en dosel y raíz (Figura 1 y 2), cuya severidad puede depender de las especies de hongos implicados, manejo y edad de huerto, y características físico-químicas del suelo. Debido a la baja frecuencia de *P. cinnamomi* en este estudio, y al cambio detrimental de régimen hídrico, posiblemente este organismo está siendo desplazado por otros hongos con mayor capacidad parasítica.

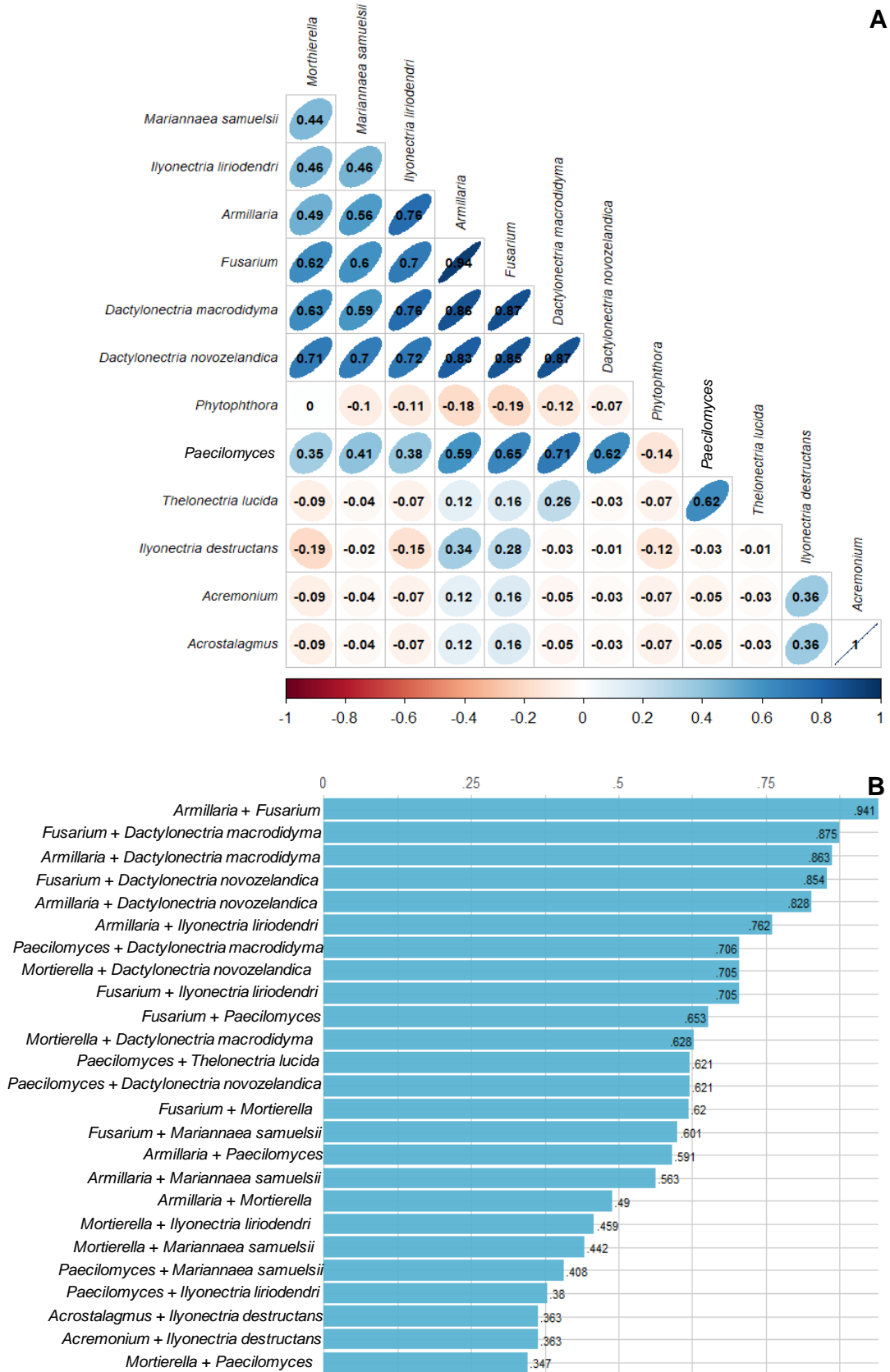


Figura 8. Gráficas de asociatividad de organismos aislados de raíces de aguacate con síntomas de síndrome de declinamiento. **A.** Correlación de Pearson (r) que muestra asociación entre nectriales y otros organismos de raíz; y **B.** Cross-correlación en pares y ordenada por nivel de asociatividad para las 25 principales correlaciones significativas.

CONCLUSIONES

Este es el primer reporte que proporciona evidencias de la implicación regional de un complejo hongos, con potencial asociación de especies necotriales, en un proceso infeccioso que resulta en síntomas de marchitez generalizada de intensidad variable; defoliación descendente progresiva; reducción del crecimiento de hojas y frutos; raíces secundarias con lesiones rojizas subcorticales, seguido de lesiones necróticas invasivas en médula y subcorticales. Se propone el 'síndrome de declinamiento del aguacate' para denotar a esta enfermedad. A nivel mundial se reporta por segunda ocasión a *Mariannaea samuelsii* asociado a aguacate, y *Thelonectria lucida* por primera vez. Otros necotriales con menor frecuencia regional fueron *Dactylonectria macrodidyma*, y *D. novo-zelandica*. Sin embargo, *I. liriodendri* fue el más prevalente y recurrentemente asociado con *Armillaria* spp. y *Fusarium* spp., en regiones con mayor inductividad epidémica potencial. Este escenario parasítico complejo representa un riesgo emergente para la producción de aguacate en Michoacán y otras regiones. Esta investigación se debe complementar con pruebas de patogenicidad y estudios de prevalencia-diversidad de especies, haplotipos y niveles de agresividad con el fin de coadyuvar a un manejo sustentable del cultivo.

AGRADECIMIENTOS

A CONHACYT por la beca otorgada para la estancia posdoctoral a la primera autora, al equipo CP-LANREF por las facilidades y el apoyo en el desarrollo de la investigación. Al MC Jorge Valdez Carrasco por la colaboración para la toma y edición de fotografías. A los productores de aguacate por su participación para toma de muestras y los datos proporcionados de sus huertos. Al Ing. Jairo Grajeda e Ing. Caín Flores Sanabría por el apoyo y vinculación con los productores de las Juntas Locales de Sanidad Vegetal de Pátzcuaro, Uruapan, Tancítaro y Peribán.

REFERENCIAS

- Agustí BC and Armengol J. 2013. Black-foot disease of grapevine: An update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 245-261. 10.14601/Phytopathol_Mediterr-12662
- Androsiuk P, Okorski A, and Pauksto Ł. Jastrzębski JP, Ciesielski S, and Pszczółkowska A. 2022. Characterization and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the pathogenic fungus *Ilyonectria destructans*. *Scie Reports* 12: 2359. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05428-z>.
- Cabral A, Groenewald JZ and Rego C. 2012a. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *I. radicola* species complex. *Mycological Progress* 11: 655-688. 10.1007/s11557-011-0777-7.
- Cedeño L, Carrero C, Quintero K, Pino H, y Espinoza W. 2004. *Cylindrocarpon destructans* var. *destructans* and *Neonectria discophora* var. *rubi* associated with black foot rot on blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) in Mérida, Venezuela. *INCI* 29 (8): 455-460. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000800011&lng=es.
- CESAVEMICH. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Michoacán. Obtenido de <https://cesavemich.org.mx/index.php/campana-contra-plagas-reglamentadas-del-aguacate/>. Consultado el 18 de Octubre de 2022.

- Dann E, Forsberg L, Cooke A, Pegg K, Shivas R, and Pei-Tan Y. 2011. Pathogenicity studies in avocado with three nectriaceous fungi, *Colonectria ilicicola*, *Gliocladiopsis* sp. and *Ilyonectria liriodendri*. Plant Pathology 61:821-1010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02579.x>.
- dos Santos R F; Durigon M R; Blume E. 2015. Aggressiveness of *Ilyonectria* spp. and “*Cylindrocarpon*” *pauciseptatum* associated with black foot disease of grapevine. Revista Brasileira de Ciências Agrárias 10 (1): 49-53. <https://www.redalyc.org/pdf/1190/119038296007.pdf>. 10.5039/agraria.v10i1a4701
- Gordillo A, Decock C. 2017. *Cylindrocarpon*-like (Ascomycota, Hypocreales) species from the Amazonian rain forests in Ecuador: additions to *Campylocarpon* and *Dactylonectria*. Cryptogamie. Mycologie 38: 409–35. <https://doi.org/10.7872/crym/v38.iss4.2017.409>
- Katoh K, Rozewicki J. and Yamada KD. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Briefings in Bioinformatics. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Halleen F, Schroers H-J, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, and Crous PW. 2006. *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. Studies in Mycology 55:227–234. <https://doi:10.3114/sim.55.1.227>
- Huelsenbeck JP. and Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 754-755. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>.
- Lawrence DP, Nouri MT and Trouillas FP. 2019. Taxonomy and multi-locus phylogeny of *Cylindrocarpon*-like species associated with diseased roots of grapevine and other fruit and nut crops in California. Fungal Systematic and Evolution 4: 59-75. <https://doi.org/10.3114/fuse.2019.04.06>
- Lombard L, Van der Merwe NA, Groenewald JZ, and Crous PW. 2015. Generic concepts in Nectriaceus. Studies in Mycology 80: 189-245. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.12.002>
- López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G, and Santana-Peñaloza B. 2019. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. Revista Mexicana de Fitopatología 38(1): 79-106. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1911-4>
- Mendoza-Ramos C, Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ., Santana-Peñaloza B, Acevedo- Sánchez G, Martínez-Bustamante V, Gutiérrez-Espinosa MA, y Rubio-Cortés R. 2021. *Fusarium* spp. y estimación de carga de inóculo asociados a hijuelos de *Agave tequilana* en diferentes niveles de inductividad epidémica regional. Revista Mexicana de Fitopatología 39(1): 94-121. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-8>.
- Michua-Cedillo J, Téliz Ortíz D, Ochoa-Ascencio S, Rodríguez-Guzmán MP, Alarcón A, de León C, y Vázquez-Marrufo G. 2024. *Armillaria gallica* asociado a la pudrición de raíz del aguacate en Michoacán. Revista Mexicana de Fitopatología 42(2): 19. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2307-7>
- Mora B, Cabral A and León M. 2018. Survey, identification, and characterization of *Cylindrocarpon*-like asexual morphs in spanish forest nurseries. Plant Disease 102: 2083–100. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0171-RE>.
- Olalde-Lira GG, Raya YA, Apéaz P, Vargas-Sandoval M, Pedraza ME, Raymundo T, Valenzuela R, y Lara-Chávez MBN. 2020. Characterization of *Fusarium* spp., a phytopathogen of avocado (*Persea americana* Miller var. *drymifolia* (Schltdl. and Cham.) in Michoacán, México. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias 52(2): 301-316. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652020000200024
- Parkinson L, Shivas R and Dann E. 2017. Pathogenicity of nectriaceous fungi on avocado in Australia. Phytopathology 1479-1485 p. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-17-0084-R>
- Petit E. and Gubler WD. 2005. Characterization of *Cylindrocarpon* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. Plant Disease 89: 1051–1059. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1051>
- Rahman, M., and Punja, Z. K. 2005. Factors influencing development of root rot on ginseng caused by *Cylindrocarpon destructans*. Phytopathology 95:1381-1390. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1381>.
- Rivas-Valencia P, Almaraz-Sánchez A, Cano-Salgado A, Hernández-Ramos L, Alanís-Martínez I, y Fernández-Montes MR. 2017. Dieback disease of *Prunus* sp. associated an *Armillaria* spp. in commercial orchards in Michoacan, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 35(3): 463-475. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1702-1
- SADER. 2022. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/arrancan-trabajos-para-exportar-este-ano-aguacate-de-jalisco-a-estados-unidos-297541?idiom=es>. Consultado el 18 de octubre de 2022.
- SIAP. (2022). Servicio De Informacion Agroalimentaria y Pesquera. Obtenido de http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do. Consultado el 17 de octubre del 2022.

- Schroers HJ, Žerjav M, Munda A. 2008. *C. pauciseptatum* sp. nov., with notes on *Cylindrocarpon* species with wide, predominantly 3-septate macroconidia. Mycological Research 112: 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.10.004>
- Úrbez JR, Haag P, Bowen P. 2014. Grapevine trunk diseases in British Columbia: incidence and characterization of the fungal pathogens associated with black foot disease of grapevine. Plant Disease 98: 456–468. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0524-RE>
- Téliz D, Mora A. 2007. El Aguacate y su Manejo Integrado. México. Mundiprensa. 219-321 pp.