

Caracterización de los microorganismos asociados con el daño de la lenticela en *Persea americana* cv. Hass en plantaciones colombianas.

Carolina Cataño-Useche¹, Valeska Villegas-Escobar^{1,2}, Sandra Mosquera^{1,2}

¹Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad EAFIT, Medellín, Colombia

²Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Bioprocesos (CIBIOP), Departamento de ciencias biológicas, Universidad EAFIT, Carrera 49 n° 7 sur 50, Medellín, Colombia

Resumen

El daño a la lenticela es una afectación que limita la producción de *Persea americana* cv. Hass. Daños de lenticela severos afectan la calidad del fruto y disminuyen su valor. Existe escasa información acerca de la causalidad de esta afectación y la que está disponible es inconsistente. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar los microorganismos cultivables asociados a lenticelas sintomáticas con el fin de evaluar su participación en el desarrollo del daño de la lenticela de *P. americana* cv. Hass. En el trabajo, 63 microorganismos fueron aislados a partir de frutos con síntomas típicos del daño de la lenticela provenientes dos unidades productivas pertenecientes al grupo Cartama y con prevalencias diferenciales del daño. Estos microorganismos fueron identificados molecularmente y su potencial patogénico evaluado en frutos sanos de *P. americana* cv. Hass. No se evidenciaron diferencias entre los aislados provenientes de las dos unidades productivas los cuales estuvieron enriquecidos en *Colletotrichum* spp capaces de generar afectaciones en frutos sanos. Muchos de los géneros aislados ya habían sido asociados al daño de la lenticela, sin embargo, otros como *Phyllosticta* y *Nigrospora* no habían sido reportados. El potencial patogénico de *Phyllosticta* fue corroborado. A pesar de que no se logró agente causal del daño de la lenticela pues el daño no pudo ser replicado in vitro, los resultados de este trabajo aportan al entendimiento del daño de la lenticela de *P. americana* cv Hass y da pie a futuras evaluaciones.

1.Introducción

Persea americana (Miller, 1768), más conocida como aguacate o palta, es una especie perteneciente a la familia Lauraceae la cual comprende entre 2.500 y 3.000 especies aproximadamente, que se distribuyen por todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Renner, 2004). Muchas de estas especies son de importancia económica y, entre estas, *P. americana* se destaca por su alto contenido proteico, de aceites, vitaminas A, B1, C D, ácido fólico, biotina y minerales como cobre, magnesio, potasio y sodio (Schaffer et al., 2013; Siddiq et al., 2012). El origen de *P. americana* ha sido asociado a América central, en particular a México y Guatemala. Esta zona posee una alta diversidad de la especie (Galindo-Tovar & Arzate-Fernández, 2010) y es en donde se originaron algunos de los cultivares con mayor valor

comercial como lo son el cv. Hass, el cv. Fuerte y el cv. Nabal (Álvarez et al., 2015; DANE¹, 2016). En particular, *P. americana* cv. Hass se obtuvo a partir del cruce entre la variedad mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) y guatemalteca (*P. nubigena* var. *guatemalensis*). Este cultivar es altamente productivo, auto fértil y genera frutos con contenidos de grasa entre el 17% y el 21% y pesos entre los 150 gm y los 400 gm. Estas frutas también se caracterizan por su lenta maduración y su mayor calidad en la pulpa. Todas estas razones hacen que el 80% del aguacate que se consume en el mundo sea del cv. Hass (Bernal, 2014; Schaffer et al., 2013).

Actualmente, Colombia cuenta con alrededor de 15.5 mil ha cultivadas de *P. americana* cv. Hass que producen cerca de 95.3 mil Ton de fruta al año. Gran parte de esta fruta se exporta a países como Canadá, Estados Unidos, países de la Unión Europea, Rusia, entre otros. A pesar de su reciente apogeo, este cultivo no alcanza su potencial productivo en el país. El rendimiento de estos cultivos se estima es alrededor de 9.0 Ton/ha, el cual es bajo, considerando que el rendimiento potencial de *P. americana* cv. Hass es cercano a las 30 Ton/ha (Granados Pérez & Valencia Rincón, 2018). Por otro lado, la producción de aguacate colombiano también está limitado por problemas que afectan la calidad de la fruta asociados con calibres bajos, afectaciones producidas por patógenos, quemaduras solares y daños en la epidermis. Estos problemas causan pérdidas de alrededor USD 80.3 por Ton de fruta producida (Ramírez-Gil et al., 2020).

Múltiples factores son determinantes para los rendimientos y la calidad de la fruta en los cultivos de *P. americana* cv. Hass. El clima es uno de ellos. La producción de *P. americana* cv. Hass es favorecida por climas fríos moderados típicos de los pisos térmicos que se encuentran entre los 1,800 a 2,600 msnm en el país (Bernal, 2014). Los manejos a que se someten los árboles y los frutos durante la cosecha y la postcosecha también son determinantes pues unos buenos manejos resultan en un mayor número de frutos que satisfacen los estándares de calidad para exportación (Bernal, 2014). Por el contrario, las enfermedades y afectaciones que impactan los frutos durante la cosecha y la postcosecha son factores limitantes. Entre estas enfermedades y afectaciones, el daño de la lenticela se destaca. Esta afectación, aunque puede ser observada en el fruto durante la cosecha, es más evidente durante la postcosecha. El daño de la lenticela se caracteriza por la aparición de manchas de color café oscuro o negro bien definidas con diámetros entre 1 mm y 5 mm que se desarrollan alrededor de la lenticela y se limita al exocarpo del fruto (Everett et al., 2008; Everett et al., 2001).

El daño de la lenticela es una afectación particularmente limitante para los productores pues esta entre los factores que se analizan para determinar el valor comercial del fruto y el mercado al que estará destinado (nacional o internacional) (CODEX, 2013). Para *P. americana* cv. Hass, las pérdidas derivadas del daño de la lenticela se estiman cercanas a USD 4.8 por Ton producida, un valor superior a las pérdidas causadas por otros factores como daños producidos por ácaros, quemaduras solares y daños por golpes (Ramírez-Gil et al., 2020). Las pérdidas derivadas de

¹ Departamento administrativo nacional de estadística

este daño por lo general se aumentan debido que facilita la entrada de diferentes fitopatógenos, lo que resulta en afectaciones más severas y un mayor daño del fruto (Everett et al., 2008).

Las causas del daño de la lenticela no son claras y son motivo de controversia. Actualmente, el estrés mecánico sufrido por el fruto durante la cosecha y la postcosecha es una de las causas más aceptadas. Se hipotetiza que la necrosis observada en las lenticelas resulta de la oxidación de polifenoles que son liberados por células que mueren a causa del estrés mecánico (Zamora-Magdaleno et al., 2001). Otra posible causa son las infecciones causadas por hongos fitopatógenos. Algunos trabajos reportan el aislamiento de *Pseudocercospora purpurea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Dothiorella gregaria* a partir de lenticelas con síntomas característicos del daño a la lenticela, sugiriendo la participación de estos hongos en la generación de estos síntomas (Tamayo Molano, 2007; Zamora-Magdaleno et al., 2001). Consecuente con esta hipótesis, la aplicación de fungicidas durante la cosecha reduce la severidad del daño de la lenticela (Reina Noreña et al., 2015). La participación de bacterias fitopatógenas actualmente no puede ser descartada ya que *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* también ha sido asociada a lenticelas sintomáticas (Scortichini, 2010; Smith, 1925).

Diversas evaluaciones han demostrado que humedades altas durante la cosecha y la postcosecha se asocian a severidades más altas de daño de la lenticela (Everett et al., 2001; Everett et al., 2008; Milne, 1998; Schonenberger, 1999). Estos incrementos en la severidad son consecuentes con ambas hipótesis. Por un lado, los frutos hidratados presentan células en hiperplasia, las cuales son más susceptibles al estrés mecánico. Por el otro, microorganismos patógenos, como *C. gloeosporioides*, requieren de humedades altas para establecer la infección (Alkan & Fortes, 2015; Everett et al., 2008; Milne, 1998). Con el fin de esclarecer las causas del daño de la lenticela, el presente estudio busca evaluar la participación de microorganismos fitopatógenos en esta afectación. Específicamente, se determinarán cuáles son los microorganismos cultivables asociados al daño de la lenticela en dos unidades productivas de *P. americana* cv. *Hass* ubicadas en dos regiones diferentes de Colombia y se evaluará su capacidad de reproducir la enfermedad.

2. Materiales y métodos

2.1 Descripción de las unidades productivas y toma de muestras

Dos unidades productivas (UP) del grupo Cartama con diferentes condiciones agroclimáticas y niveles de afectación del daño de la lenticela se seleccionaron para el estudio (Tabla 1). Veinticinco frutos maduros (con materia seca de 24%) con síntomas típicos del daño de la lenticela y necrosis del pedúnculo se seleccionaron al azar para cada UP de las cosechas principales del 2019. Estos frutos fueron cosechados con sus pedúnculos, sumergidos en una solución de Timorex Gold ® (Stockton, Israel) a 2 ml/l y transportados a la universidad EAFIT en donde se almacenaron por 21 días a 6°C tratando de simular las condiciones a las que son sometidos los frutos de exportación durante la postcosecha.

Tabla 1. Descripción de las condiciones geográficas, climáticas y el nivel de afectación del daño de la lenticela para las dos unidades productiva del grupo Cartama.

Unidad productiva	Altura (msnm)	precipitación anual (mm)	Temperatura anual promedio (°C)	Ubicación	Humedad relativa anual promedio (%)	Daño lenticela
Sinaí	2000	1670	14.5	Anserma, (Caldas (5° 16' 57.12" N 75° 47' 59.23" O)	87	Alto
Escondida	2200	2248	16	Rionegro, Antioquia (6° 5' 58.274" N 75° 26' 30.48" O)	85	Bajo

2.2 Aislamiento de los microorganismos asociados al daño de la lenticela

Para cada UP, muestras de alrededor 25 mm² de área y 3 mm de profundidad con tejido sano y sintomático se tomaron del exocarpo y del pedúnculo de 20 de los 25 frutos para los aislamientos fúngicos. Los 5 frutos restantes se emplearon para los aislamientos bacterianos. En estos frutos se tomaron muestras similares, pero solo del exocarpo. La superficie de estas muestras se esterilizó empleando hipoclorito de sodio (ProtoKimica, Colombia) al 2% por 5 minutos y etanol (ProtoKimica, Colombia) al 70% por un minuto, seguido por tres lavados con agua destilada estéril. Para los aislamientos fúngicos, las muestras de exocarpo o de pedúnculo fueron sembradas en cajas Petri con agar de papa y dextrosa (PDA, de sus siglas en inglés) (Alpha Bioscience, USA) al 50% y se incubaron a 30°C hasta observar crecimiento micelial. El micelio resultante fue sometido a múltiples pases en PDA al 50% hasta la obtención de colonias puras las cuales fueron almacenadas en glicerol (ITW reagents, Colombia) al 20% a -80°C y activadas en PDA al 50% por 8 días a 30°C para su caracterización.

Para los aislamientos bacterianos, se emplearon muestras compuestas que constituían en 4 muestras de exocarpo provenientes de un mismo fruto. Estas muestras compuestas se pasaron a un Erlenmeyer de 250 con 50 ml de buffer fosfato (1.0 M, PH: 7) e incubaron por 24 horas a 120 rpm y 30°C. El sobrenadante se recuperó y centrifugo a 4500 rpm por 15 minutos, y el pellet resultante se sembró en cajas Petri con agar tripticasa de soya (TSA, de sus siglas en inglés) (Oxoid, Inglaterra) al 50% por agotamiento. Las cajas fueron incubadas a 30°C por 48 horas, tiempo a partir del cual se evidenciaron las colonias bacterianas. Las cajas en donde se evidenció una morfología bacteriana dominante se seleccionaron y, a partir de estas, se tomó una colonia e inocularon en un tubo Falcón de 15 ml con 10 ml de caldo tripticasa de soya (TSB, de sus siglas en inglés) (Oxoid, Inglaterra). Los tubos se incubaron a 120 rpm y 30°C

por 48 horas y centrifugaron a 4500 rpm por 15 minutos. El pellet resultante se almacenó en glicerol al 20% a -80°C y se activó en TSA al 50 % por 48 horas a 30°C previo las evaluaciones.

2.3 Caracterización e identificación de los microorganismos asociados al daño de la lenticela

La caracterización morfológica de las colonias de los aislados se hizo visualmente a partir de colonias fúngicas crecidas en PDA al 50% por 8 días y colonias bacterianas crecidas en TSA al 50% por 48 horas, ambas a 30°C . Para las cepas fúngicas, la morfología del micelio y de estructuras reproductivas se caracterizó empleando un microscopio óptico (Carl Zeiss) con el objetivo seco a una magnificación de 40X. Para las cepas bacterianas, las células se tiñeron con la tinción Gram y su morfología se caracterizó en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión a una magnificación de 100X.

Para la identificación molecular, DNA genómico se extrajo de la biomasa obtenida a partir de cultivos de 48 horas en caldo Sabroud (Merck, Alemania) para los aislados fúngicos o en TSB para los bacterianos. En el caso de los hongos, la homogenización del micelio se hizo con nitrógeno líquido y fuerza mecánica con la ayuda de un mortero y la extracción de DNA se hizo con el DNeasy powersoil kit siguiendo las indicaciones del fabricante (Quiagen, Alemania). Para las bacterias, la extracción de DNA se hizo empleando el protocolo de Dellaporta et al., (1983). Específicamente, se utilizó 500 μl de buffer de lisis para el rompimiento celular y 150 μl de una solución de acetato de potasio (PH,4.8), para la separación del DNA se usó isopropil alcohol (ITW Reagents, Alemania) y los lavados se realizaron con etanol al 70% (Sigma,). El pellet de DNA fue almacenado en 50 μl de TE.

Un volumen de 2.5 μl del DNA genómico extraído se empleó en reacciones de PCR de 25 μl de GoTaq® Green Master (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. Un fragmento de aproximadamente 550 pb del espaciador transcrito interno (ITS, de sus siglas en ingles) de la región del ADN ribosómico se amplificó con los primers ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCCTGCGG-3') y ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para los aislados fúngicos y, para los bacterianos, un fragmento de aproximadamente 1450 pb del gen ribosomal 16S con los primers 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Las amplificaciones resultantes fueron enviadas a MacroGen (Corea del sur) para su secuenciamiento en ambas direcciones (forward y reverse) con el método Sanger empleando como primers de secuenciamiento los mismo primers empleados para la amplificación en la PCR. El primer 1492R fue la excepción ya que fue remplazado por el primer interno 907R (5'- CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3').

Para la asignación taxonómica, los electroferogramas de las dos secuencias obtenidas (forward y reverse) fueron visualizados y los extremos de las secuencias trimados manualmente teniendo la calidad de la secuencia como criterio. Estas secuencias fueron alineadas empleando un alineamiento global con free end gaps y un costo de matriz con el 65% de similaridad en Geneious Prime (versión 2020.2.4) para obtener una secuencia

consenso por organismo. En los casos en los que no se contaba con ambas secuencias, es decir, cuando la calidad de una de ellas no era confiable, se empleó una única secuencia en lugar de la secuencia consenso.

Para los aislados bacterianos, la asignación se hizo comparando las secuencias de cada aislado con otras secuencias reportadas en el GenBank empleando la herramienta Nucleotid Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1990). Para los aislados fúngicos, un alineamiento similar al empleado para obtener las secuencias consenso se realizó incluyendo las secuencias de los aislados y secuencias de cepas tipo (Tabla Anexo 1) de organismos asociados a patologías de aguacate. El alineamiento obtenido se empleó para la construcción de un árbol filogenético por medio del método estadístico maximum likelihood en MEGA (Versión X-64). Este análisis empleo una sustitución tipo nucleotídica con el modelo kimura2- parameter y un tratamiento de gaps de delección completa y el método filogenético empleado fue Bootstrap con 100 réplicas. La agrupación del árbol filogenético obtenido fue empleada para la asignación taxonómica de los aislados fúngicos.

2.4 Evaluación de diferencias entre los aislados fúngicos según el origen de aislamiento

La prueba exacta de Fisher se empleó para evaluar diferencias entre los aislados fúngicos procedentes de las dos UP y de los dos tejidos de aislamiento (exocarpo y pedúnculo). para el análisis se utilizó el programa R Core Team, 2020, del cual se usó la función ‘fisher.test’ del paquete Stats versión 4.04. usando un nivel de confianza del 95% en el análisis de los datos. Por su parte, la diversidad alfa de las comunidades fúngicas aisladas se calculó empleando la función ‘Diversity’ del paquete Vegan versión 2.5.7 (Oksanen et al., 2020).

2.5 Ensayos de patogenicidad

Para la preparación de los inóculos para los ensayos de patogenicidad, los aislados fueron activados en PDA al 50% o en TSA al 50% según lo especificado y crecidos en tubos falcón de 15 ml con 10 ml de caldo Sabroud para los aislados fúngicos y TSB para los bacterianos. Los tubos se incubaron por 48 horas a 120 rpm y 30°C y se centrifugaron por 15 minutos a 4500 rpm. Los pellets de biomasa obtenida a partir de estos cultivos se recuperaron y el sobrenadante se descartó.

Los pellets miceliales se maceraron en tubos Falcón de 15 ml que contenían 5 perlas de vidrio (4 mm de diámetro; Merck) y aproximadamente 5 ml de caldo Sabroud los cuales se agitaron por 2 minutos con la ayuda de un vortex (vortexer) a la velocidad máxima de agitación. La suspensión micelial obtenida se trasladó a tubos eppendorf de 2 ml a los que se les adicionó un volumen equivalente de una mezcla de infección compuesta por tween 80 al 0.05% (Merck, Alemania), caldo Sabroud 2% y CMC 0.05% (ProtoKimica, Colombia). La concentración de estas suspensiones miceliales se ajustó a 5×10^5 fragmentos de micelio/ml de mezcla de infección empleando una cámara de Neubauer (BOECO, Alemania). En el caso de los pellets bacterianos, estos se suspendieron en la mezcla de infección y su densidad óptica a 600 nm se ajustó para que estuviera entre 0.5 y 0.8 empleando un espectrofotómetro

Genesys 10s (Thermo scientific). Las suspensiones fúngicas y bacterianas resultantes sirvieron de inóculo para las evaluaciones de patogenicidad.

Dos ensayos de patogenicidad de tamizaje se realizaron con el fin de identificar los aislados con potencial patogénico. Estas evaluaciones incluyeron todos los aislados fúngicos y bacterianos y fueron seguidas por una tercera evaluación la cual solo incluyó los aislados con potencial patogénico. Las tres evaluaciones emplearon frutos sanos de *P. americana* cv. Hass con materia seca del 24% aproximadamente los cuales se desinfectaron con etanol al 70% antes de las inoculaciones.

En las evaluaciones de tamizaje, los frutos se inocularon con 2 µl de las suspensiones fúngicas y bacterianas empleando dos tipos de inoculación, en el primero, la inoculación se asistió con una herida de 2 mm aproximadamente de ancho y de profundidad en el sitio de inoculación. Esta herida se hizo con una aguja estéril. En el segundo, los 2 µl de muestra se esparcieron en un aro de 2 cm² aproximadamente con un isopo. Los sitios de inoculación fueron marcados y los frutos inoculados se secaron a 23°C e incubaron a 18°C en cámaras de humedad por 12 días. La evaluación de síntomas se hizo cada 3 días de manera visual y las cámaras de humedad constituían tupperwares plásticos (Wepon) con toallas de papel húmedas en el fondo. Los frutos se ubicaron sobre cajas de Petri estériles de 60 mm para evitar que entraran en contacto con las servilletas húmedas. Las evaluaciones incluyeron 5 inoculaciones por aislado para cada tipo de inoculación (con herida y con isopo). Cada fruto fue inoculado en 10 sitios diferentes los cuales incluían 8 suspensiones de aislados bacterianos o fúngicos, un control agua y un control mezcla de inoculación. La distribución de los aislados en los frutos se hizo de manera aleatoria hasta completar las 5 réplicas biológicas.

Adicional a la patogenicidad de los aislados en los frutos, estas evaluaciones preliminares también evaluaron la patogenicidad de los aislados en el pedúnculo. Para esto, 2 µl de las suspensiones fúngicas y bacterianas se inocularon en pedúnculos sanos adheridos al fruto a 0,5 cm de la zona en que estos se adhieren al fruto. Las inoculaciones se hicieron de manera similar a la inoculación de los frutos que incluían herida y la incubación de los frutos con los pedúnculos inoculados se hizo como se describió anteriormente. Tres pedúnculos se inocularon por aislado como réplicas biológicas y los controles agua destilada estéril y mezcla de inoculación también fueron incluidos en estas evaluaciones.

Los resultados de estas dos evaluaciones permitieron seleccionar los aislados con potencial patogénico. Específicamente, los aislados se consideraron patogénicos cuando presentaron algún tipo de síntoma (Figura 5) en al menos 3 sitios de inoculación, independiente del tipo de inoculación. Aquellos aislados que causaron necrosis del pedúnculo también fueron seleccionados. Solo 10 aislados fúngicos cumplieron este criterio y fueron evaluados en un tercer ensayo. Para este ensayo, el exocarpo de los frutos de *P. americana* cv. Hass se impregno con las suspensiones de inoculación de un aislado con la ayuda de un isopo estéril. Estas evaluaciones incluyeron 4 frutos por aislado como réplica biológica y también incluyeron los controles agua destilada estéril y mezcla de inoculación. Los frutos se secaron e incubaron según lo anterior y para la evaluación de síntomas se tomaron fotos al inicio (t_0)

de la evaluación y después de una semana de incubación (t_1) para calcular el aumento de lenticelas.

3. Resultados

Un total de 63 aislados fueron obtenidos a partir del exocarpo y del pedúnculo de frutos de *P. americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela que provenían de las UP del grupo Cartama, El Sinaí y La Escondida (Tabla 2; Tabla anexo 2). El 82.5% de los aislados (52 aislados) fueron fúngicos y los demás (11 aislados) bacterianos. De los aislados fúngicos, 30 provenían de frutos de la UP El Sinaí, correspondientes a 16 aislados del pedúnculo y 14 del exocarpo del fruto. Los 22 restantes provenían de frutos de la UP La Escondida, con 6 aislados del pedúnculo y 16 del exocarpo del fruto. En el caso de los aislados bacterianos, 4 provenían del exocarpo de frutos de la UP El Sinaí y 7 del exocarpo de frutos de la UP La Escondida. Estas evaluaciones no incluyeron aislados bacterianos provenientes del pedúnculo.

Tabla 2. Microorganismos aislados a partir lenticelas sintomáticas y pedúnculos necrosados de frutos de *Persea americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela discriminados según la procedencia.

Microorganismo	Unidad Productiva				Total
	Sinaí		Escondida		
	Tejido vegetal				
	Pedúnculo	Fruto	Pedúnculo	Fruto	
Hongos	16	14	6	16	52
Bacterias	NA *	4	NA	7	11
Aislados con asignación Taxonómica					
Hongos	8	11	6	11	36
Bacterias		4		6	10

*NA: No aislados

3. 1 Caracterización morfológica de los aislados

Todos los aislados fúngicos presentaron micelio septado y en su mayoría colonias algodonosas y filamentosas, con patrones de colores y texturas variables (Figura 1A-H). Los aislados se clasificaron en 8 grupos morfológicos definidos con base en las morfologías de colonias predominantes observadas (Figura 1 B-H y Tabla 3). Los grupos 1 y 2 contenía el mayor número de aislamientos con el 22.6% (12 aislados) y el 21.0% (11 aislados). Seguido por el grupo 3 con el 13.2% (7 aislados), el grupo 4 y 5 con el 9.4% (5 aislados), cada uno,

el grupo 6 con el 5.6% (4 aislados) y el grupo 7 con un 3.8% (2 aislados) (Tabla anexo 2). Los demás aislados (7 aislados) no fueron incluidos en los grupos morfológicos pues tenían una morfología de colonia distintiva o la morfología no fue caracterizada pues estos perdieron viabilidad durante el proceso de almacenamiento (16 aislados). Algunos aislados desarrollaron estructuras reproductivas bajo las condiciones evaluadas. Tres tipos de estructuras fueron observados (Figura 1 I-K). Las estructuras más comunes fueron esporas unicelulares, cilíndricas y hialinas (Figura 1 I) observadas para la mayoría de los aislados del grupo morfológico 2 (9 aislados) y tres aislados del grupo morfológico 4. Dos aislados de los grupos morfológicos 4 y 5 presentaron esporas semicilíndricas y melanizadas con septos horizontales y verticales (Figura 1 J) y un aislado del grupo 3 presento estructuras melanizadas circulares (Figura 1 K) (Tabla anexo 2).

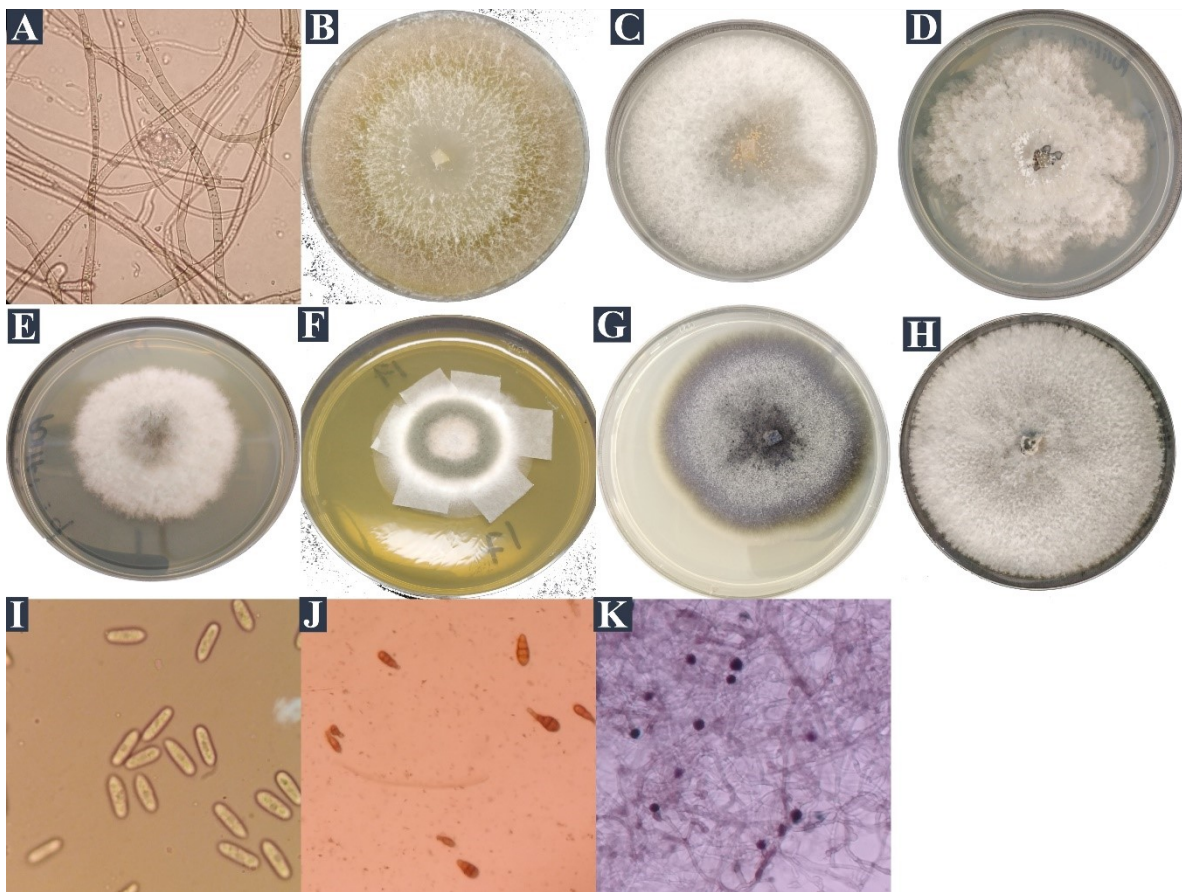


Figura 1. Caracterización morfológica de los aislados fúngicos obtenidos a partir lenticelas sintomáticas y pedúnculos necrosados de frutos de *Persea americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela provenientes de las unidades productivas El Sinaí y La Escondida. A) Imagen representativa del micelio septado. B-H) Fotos representativa de los ocho grupos morfológicos. J-K) Imágenes de las estructuras reproductivas formadas por los aislados fúngicos. Las fotos corresponden a cultivos de 8 días en PDA al 50%.

Tabla 3. Grupos morfológicos definidos para los aislados fúngicos obtenidos a partir de lenticelas sintomáticas y pedúnculos necrosados de frutos de Persea americana cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela provenientes de las unidades productivas El Sinaí y La Escondida.

Grupo	Descripción
Grupo 1	Colonia filamentosa de color blanco con textura algodonosa y crecimiento rápido, circular y regular. El centro de la colonia toma una coloración gris y posteriormente naranja, cambio de coloración que coincide con el micelio más viejo y el inicio de la esporulación.
Grupo 2	Colonia filamentosa inicialmente de color blanco con textura algodonosa y crecimiento rápido, circular y regular. La colonia y el medio de cultivo toman con el tiempo una coloración naranja y se observan aros de crecimiento sectorizado.
Grupo 3	Colonia de color blanco y crecimiento lento, circular e irregular. La colonia presenta zonas de crecimiento micelial diferenciado hacia el exterior (micelio más joven) y un cambio de coloración de blanco a gris en el centro (micelio de más edad).
Grupo 4	Colonia de crecimiento lento, circular y regular. La colonia presenta una textura algodonosa y está formada por un micelio de color blanco con crecimiento aéreo. El centro de la colonia (micelio de más edad) se torna gris.
Grupo 5	Colonia de crecimiento lento, circular y regular con textura algodonosa que se caracteriza por el desarrollo de un halo de color gris bien definido en el centro de la colonia (micelio de más edad)
Grupo 6	Colonia de color negro con crecimiento circular regular y textura polvorosa. Las colonias de más edad forman un halo micelial blanco hacia el exterior
Grupo 7	Colonia de color blanco y textura polvorosa con crecimiento rápido y rastrero

En el caso de los aislados bacterianos, todos fueron cocobacilos Gram negativos y solo dos morfologías de colonia fueron evidenciadas. Estas morfologías de colonias se emplearon para dividir los aislados bacterianos en dos grupos morfológicos (Figura 2; Tabla 4). en donde el grupo morfológico 1 fue predominante con el 72.2 % de los aislados (8 aislados).

Tabla 4. Grupos morfológicos definidos para los aislados bacterianos obtenidos a partir de lenticelas sintomáticas de frutos de *Persea americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela provenientes de las unidades productivas el Sinaí y La Escondida.

Grupos	Descripción		
	Morfología colonia	Morfología celular	Tinción Gram
Grupo 1	Colonia circular de color amarillo, con elevación convexa y margen entero	Cocobacilos	Gram negativo
Grupo 2	Colonia puntiforme de color crema y de elevación convexa, margen entero	Cocobacilos	Gram negativo

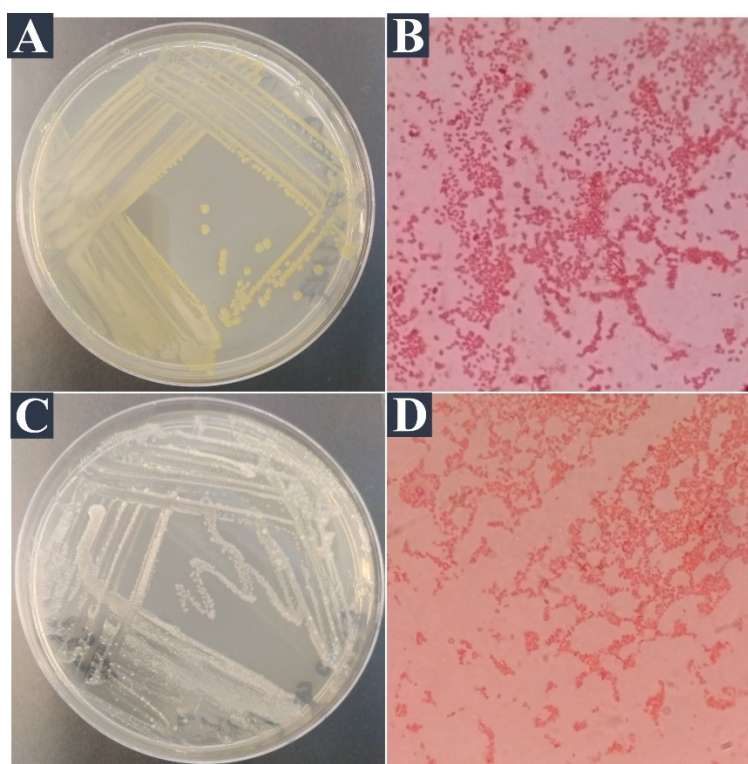


Figura 2. Caracterización morfológica de los aislados bacterianos obtenidos a partir de lenticelas sintomáticas de frutos de *Persea americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela provenientes de las unidades productivas El Sinaí y La Escondida. A y C) Imágenes representativa de los dos grupos morfológicos. B-D) Imágenes representativas de las tinciones de gram. Las fotos corresponden a cultivos de 4 días en TSA.

3.2 Asignación taxonómica de los aislados

La asignación a nivel de genero se logró para 36 aislados fúngicos (69.2%; Tabla anexo 2) y su filogenia se muestra en la Figura 3. Entre los 16 aislados que no fueron identificados estaban aquellos que perdieron viabilidad durante el proceso de almacenamiento (15 aislados) o aislados con electroferogramas de baja calidad que imposibilitaron la asignación taxonómica (1 aislado). El género *Colletotrichum* fue predominante con 13 aislados (36.1%). Otros géneros observados fueron *Neurospora*, con seis aislados (16.6%), *Nigrospora*, *Diaporthe* y *Phyllosticta*, cada uno con 3 aislados (8.3%), *Bipolaris* con 2 aislados (5.5%), *Daldinia* y *Entoanema*, con un aislado cada uno (2.7%). Cuatro aislados (11.1%) recibieron una asignación ambigua entre los géneros *Cytospora* y *Diaporthes*, ya que el fragmento de ITS empleado para la asignación no permitió diferenciar entre estos dos géneros.

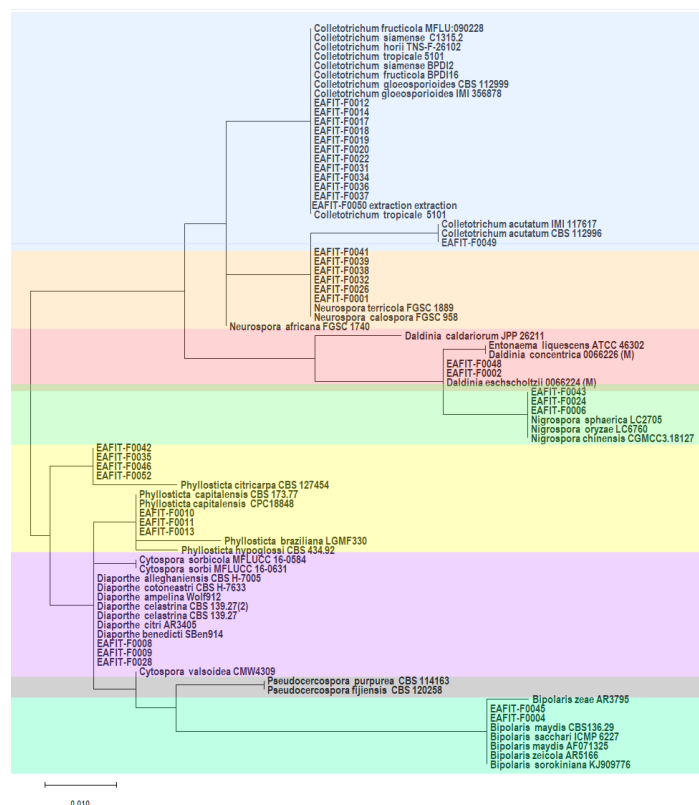


Figura 3. Mapa filogenético de los aislados fúngicos obtenidos a partir de lenticelas sintomáticas y pedúnculos necrosados de frutos de *Persea americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela provenientes de las unidades productivas El Sinaí y La Escondida. El árbol filogenético fue construido el método de máximo likelihood y muestra las agrupaciones taxonómicas de los aislados comprada con organismos tipo y su respectivo número de accesión.

La composición de las comunidades fúngicas aisladas no difería de una UP a la otra con un nivel de confianza del 95% según la prueba de Fisher (Figura 4A, P-value: 0.074). Aunque, la comunidad aislada de El Sinaí fue ligeramente más diversa según la probabilidad de

Simpson (0.78 comparada a 0.75 para La Escondida). Mientras que los géneros *Colletotrichum*, *Bipolaris*, *Nigrospora*, *Neurospora*, *Cytospora* y *Diaporthe* fueron aislados de ambas UP, géneros como *Entoanema* y *Phyllosticta* fueron exclusivos del Sinaí y *Daldinia* de La Escondida.

Contrario a lo observado para las UP, las comunidades fúngicas aisladas provenientes del exocarpo del fruto difirieron a las provenientes del pedúnculo (Figura 4B, P-value < 0.001), siendo la comunidad del pedúnculo más diversa (probabilidad de Simpson de 0.82 comparada a 0.64 para el exocarpo del fruto). *Colletotrichum* fue el taxón prevalente en el exocarpo del fruto representando el 52.2% de aislados provenientes de este tejido, respectivamente. En el pedúnculo, los taxones dominantes fueron *Neurospora*, representando el 30.8% de los aislados (4 aislados), y *Nigrospora*, representando el 23.1% (3 aislados).

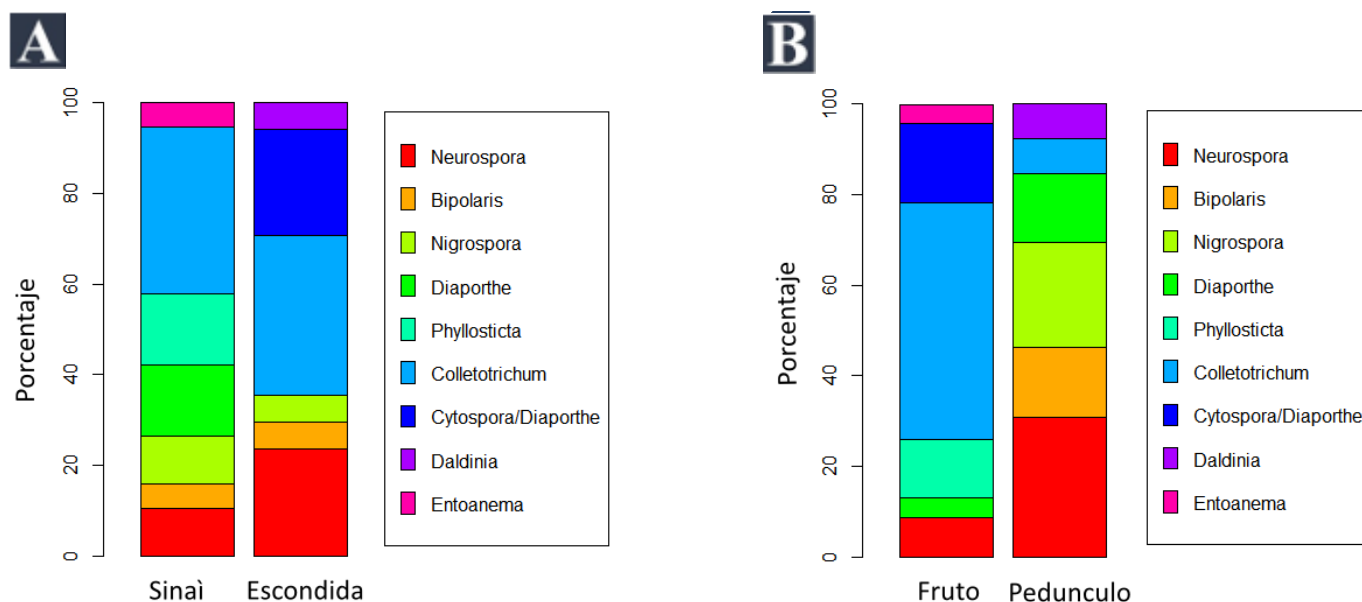


Figura 4: Comunidades fúngicas aisladas a partir de lenticelas sintomáticas y pedúnculos necrosados de frutos de *Persea americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela discriminados según A) la unidad productiva (El Sinaí y La Escondida) y B) el tejido de aislamiento (fruto y pedúnculo).

La diversidad en los aislados bacterianos fue baja observándose un género dominante (*Pantoea*) asignado al 60.0 % de los aislados (6 aislados). Los demás aislados fueron asignados a los géneros *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, y la familia Enterobacteriaceae.

3.3 Ensayos de Patogenicidad

El 30.1% de los aislados fúngicos (16 aislados) generaron alguna afectación al ser inoculados en frutos sanos de *P. americana* cv. Hass en los ensayos de tamizaje (Tabla Anexo 2). Cuatro tipos de afectaciones fueron identificadas (Figura 5): aumento del número o tamaño de las lenticelas necrosadas (Figura 5A), crecimiento micelial, (Figura 5B), pudrición del fruto (Figura 5C) y aparición de islas verdes (Figura 5D). Todas estas afectaciones coincidían con el sitio de inoculación y fueron independiente del tipo de inoculación. Los aislados bacterianos también fueron incluidos en estas evaluaciones, sin embargo, ninguno causó afectaciones por lo que fueron considerados como aislados sin potencial patogénico.

Diez aislados fueron seleccionados a partir de estos aislados que generaron afectaciones para ser evaluados en un tercer ensayo (Tabla Anexo 2). Estos se consideraron como aislados más patogénicos pues causaron más de una afectación y de manera recurrente dentro de una misma evaluación y entre las dos evaluaciones. Entre estos aislados más patogénicos, el taxon *Colletotrichum* fue recurrente con cinco aislados pertenecientes a este género. Los demás aislados pertenecieron a los géneros *Neurospora* (1 aislado), *Bipolaris* (1 aislado), *Phyllosticta* (1 aislado), y *Cytoespora* (1 aislado) (Tabla Anexo 2). La cepa EAFIT-F0023 también hizo parte de estos aislados más agresivos. La asignación taxonómica para esta cepa no estaba disponible, pero pertenencia al grupo morfológico 3. Aunque esta evaluación se realizó en contadas ocasiones no se pudieron obtener resultados, debido que los frutos maduraban de manera prematura e irregular durante el periodo de evaluación lo que imposibilitó la segunda evaluación de los síntomas.

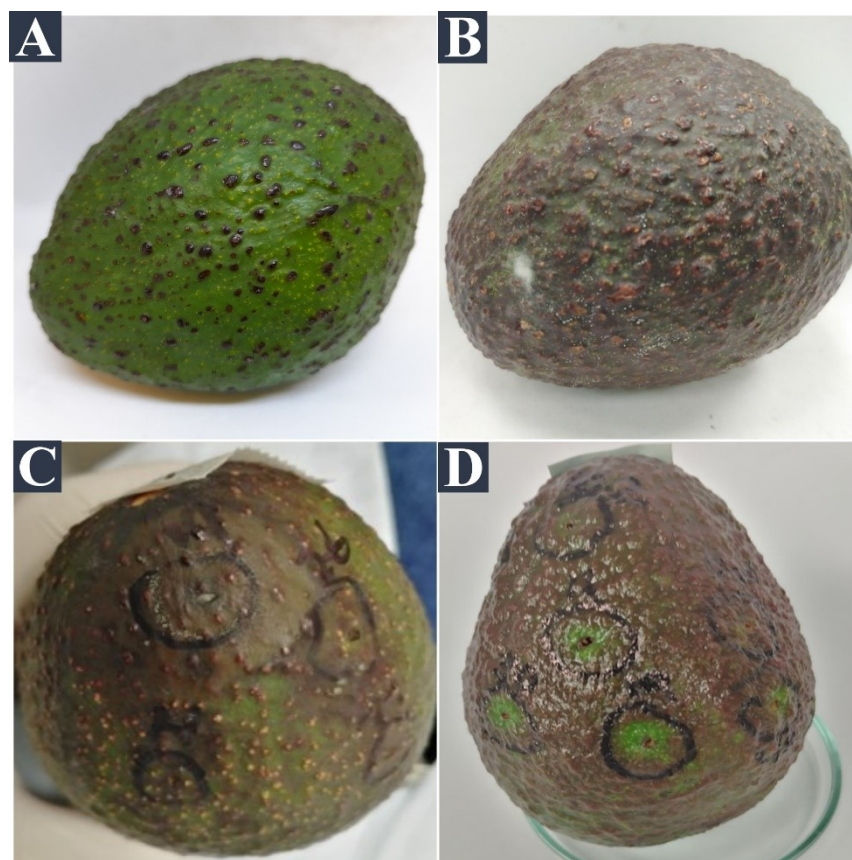


Figura 5. Afectaciones comunes observadas en frutos sanos de *Persea americana* cv. Hass inoculados con los aislados fúngicos obtenidos a partir de lenticelas sintomáticas y pedúnculos necrosados de frutos de *Persea americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela provenientes de las unidades productivas El Sinaí y La Escondida. Imágenes típicas de, A) el aumento en las lenticelas, B) el crecimiento micelial en el exocarpo del fruto, C) la pudrición del fruto alrededor de la inoculación, y D) desarrollo de islas verdes.

4. Discusión

El presente estudio aisló cepas fúngicas y bacterianas a partir de lenticelas sintomáticas y pedúnculos necrosados de *P. americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela. Muchas de las cepas fúngicas pertenecían a géneros como *Colletotrichum* y *Diaporthe* que ya habían sido reportados como géneros asociados al daño de la lenticela del *P. americana* cv. Hass en trabajos similares (Darvas, Jozsef, 1982; Tamayo Molano, 2007). Sin embargo, otros géneros como *Phyllosticta* y *Nigrospora*, que también fueron aislados, no habían sido reportados. Independiente de haber sido asociados al daño de la lenticela, la mayoría de los géneros aislados han sido reconocidos por incluir hongos fitopatógenos capaces de producir síntomas como chancros, antracnosis, manchas negras y tizón en diversos cultivos (Baayen et al., 2002; Fang et al., 2020; M. Sharma & Kulshrestha, 2015).

Colletotrichum spp. fueron predominantes entre los aislados pertenecientes a géneros con conocidos fitopatógenos. Individuos en este género se reconocen por causar antracnosis, enfermedad que ataca diferentes cultivos entre estos el aguacate, el mango, el tomate, la papaya, etc. El síntoma característico de la antracnosis son manchas necróticas que se desarrollan en diferentes tejidos del hospedero, incluyendo el exocarpo del fruto (M. Sharma & Kulshrestha, 2015; Trinidad-Àngel et al., 2017). *Phyllosticta* spp., *Nigrospora* spp., *Cytospora* spp. y *Diaporthes* spp., que también pertenecen a parte de géneros con conocidos hongos fitopatógenos, fueron igualmente aislados, pero en menor medida. *Phyllosticta* spp. está reportados como el agente causal de la peca negra o black spot en guayaba y *Nigrospora* spp. como el agente causal del tizón en diversos cultivos frutales y ornamentales de importancia económica (Baayen et al., 2002; Liao & Wang, 2020; P. Sharma et al., 2013; Wang et al., 2017). *Cytospora* spp. y *Diaporthes* spp., a pesar de ser en su mayoría saprófitos y endófitos, pueden causar chancros en cultivos como manzana, pera y pistacho (Fang et al., 2020; Nouri et al., 2019; Udayanga et al., 2011). Cabe mencionar que el género *Neurospora*, el cual fue el segundo género prevalente entre nuestros aislados después de *Colletotrichum*, es más conocido por su capacidad antifúngico que su potencial fitopatógeno (Hynes, 2003; Perkins & Davis, 2000). Solo una de nuestras cepas de *Neurospora* sp. generó síntomas en frutos de *P. americana* cv. Hass, a pesar de la prevalencia del género entre nuestros aislados, más evaluaciones son necesarias para verificar la patogenicidad de esta cepa.

Adicional a esta cepa de *Neurospora* sp, muchos de nuestros aislados mostraron un potencial patogénico al ser capaces de generar síntomas en frutos de *P. americana* cv. Hass, en especial las cepas de *Colletotrichum* spp. Sin embargo, los síntomas observados en nuestras evaluaciones fueron variados y, con excepción de tres aislados, no correspondían a los síntomas típicos del daño de la lenticela. Muchos trabajos han tratado sin éxito de replicar el daño de la lenticela en condiciones de laboratorio (K. Everett et al., 2008; É. S. Rodríguez-López et al., 2013; Trinidad-Àngel et al., 2017). La falta de éxito puede ser debida a que, para el desarrollo del daño de la lenticela, se requieran de condiciones específicas y difíciles de replicar in vitro. Por ejemplo, algunos *Colletotrichum* spp. inician la infección de manera temprana en frutos jóvenes de tomate de árbol y aguacate. Una vez establecido, el hongo entra en una fase de latencia en la cual permanece hasta que señales relacionadas con la maduración del fruto lo llevan a iniciar la fase infectiva. En esta fase, el hongo comienza un crecimiento necrótico acelerado que da lugar a los síntomas y signos de la enfermedad (Ríos, 2010; E. Rodríguez-López et al., 2009). Es posible que nuestros aislados también requieran de una fase de latencia para iniciar su infección.

Uno de los síntomas más predominantes fueron los denominados “islas verdes”, también conocidas como “biosinia verde”. Estas islas verdes están definidas como la aparición de un área de tejido verde que rodea un sitio de infección, ha sido asociada con patógenos fúngicos biotróficos. Estas islas parecen tener la función de mantener al patógeno viable pues estas aparecen al final de la infección y son el resultados de la retención o descomposición y reverdecimiento de la clorofila (Walters et al., 2008). Similar a nuestros aislados de *Colletotrichum* spp. que causaron islas verdes en aguacate, hay reportes de *Colletotrichum*

graminícola causando islas verdes en hojas de cultivo de maíz (Behr et al., 2010). La aparición de micelio blanco, más que un síntoma, es un signo de las enfermedades fúngicas y fue común en nuestras evaluaciones de patogenicidad. Muchos hongo fitopatógenos terminan su ciclo infectivo con la producción de micelio y agregados de esporas que colonizan la superficie del tejido infecto del hospedero (Pelczar et al., 2020). La pudrición, que también se encontró entre los síntomas observados en nuestras evaluaciones, está asociada a múltiples enfermedades, entre ellas destaca la antracnosis causada por hongos del género *Colletotrichum*. Esto es consecuente con el alto número de cepas de *Colletotrichum* spp. incluidas en nuestras evaluaciones (INTAGRI, 2017).

Un número limitado de trabajos han evaluado la relación entre el daño de la lenticela y fitopatógenos bacterianos (Scortichini, 2010; Smith, 1925). En particular, Smith (1925) atribuye el daño de la lenticela del aguacate a *Bacterium citriputeale*, actualmente, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Entre nuestros aislados bacterianos, solo un aislado pertenecía al género *Pseudomonas*, pero este no mostro potencial patogénico. *Pantoea*, que fue el género más común, también incluye algunos fitopatógenos capaces de causar chancros en cítricos y tizón en arroz (Sherafati et al., 2014; Toh et al., 2014). Sin embargo, este no ha sido reportado como fitopatógeno de aguacate lo que es consecuente con nuestras observaciones de que ninguno de nuestros aislados causó daño en *P. americana* cv. *Hass*. Entre nuestros aislados bacterianos también observamos *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. Enterobacteriaceae sin embargo estos tampoco han sido reportados como patógenos de aguacate y no generaron síntomas.

En este trabajo, no encontramos evidencia de que las diferentes severidades del daño de la lenticela observado para las UP este asociado a diferencias en la composición y la diversidad de las comunidades fúngicas. Las comunidades aisladas no fueron diferentes entre las UP a un nivel de confianza del 95 %, aunque vale mencionar que si se observaron diferencias a un nivel de confianza del 90 %. Otra observación importante es que algunos géneros estuvieron limitados a una UP específica. Por ejemplo, *Phyllosticta* spp. y *Entoanema* spp. solo fueron aislados del Sinaí y *Daldinia* spp. de La Escondida. Por el contrario, *Colletotrichum* spp., *Bipolaris* spp., *Nigrospora* spp., *Neurospora* spp. y *Cytospora/Diaporthes* spp. fueron aislados de ambas UP. Esto es importante porque, mientras que estos géneros comunes podrían ser considerados como parte de la microflora típica del cultivo de *P. americana* cv. *Hass*., aquellos no comunes podrían ser pensados como géneros variables que dependen de las condiciones agroclimáticas de la UP.

Con relación al sitio de aislamiento, la comunidad fúngica de aislada de lenticelas necrosadas de *P. americana* cv. *Hass* difirió de aquella aisladas de los pedúnculos con necrosis. En particular, los aislados de las lenticelas fueron menos diversos y estuvieron enriquecidos en *Colletotrichum* spp., *Phyllosticta* spp. y *Entoanema* sp. Por su lado, los aislados del pedúnculo estuvieron enriquecidos en *Daldinia* spp. y *Neurospora* spp. Estas diferencias son interesantes pues sugieren que los microorganismos responsables de la necrosis del pedúnculo no son los mismo que aquellos del daño de la lenticela. Estas observaciones tienen relevancia en términos del ciclo de vida del patógeno. Algunos hongos como parte de su ciclo infectivo infectan diferentes tejidos del hospedero. Estos tejidos pueden servir de reservorios

de inoculo capaces de causar nuevas infecciones. Este es el caso de *N. parvum* en cultivos de mango y *Colletotrichum sp.* en cereza acida en donde el inoculo que infecta el fruto proviene de esporas provenientes de infecciones de pedúnculo (Sandoval-Sánchez et al., 2013; Stensvand, 2017). Nuestros resultados sugieren que este no es el caso para el daño de la lenticela y que la fuente de inoculo no proviene de las infecciones de pedúnculo. Sin embargo, más evaluaciones son necesarias pues algunos de nuestros aislados provenientes del pedúnculo fueron capaces de causar síntomas en frutos sanos.

Durante nuestro trabajo no logramos completar los postulados de Koch, por lo que no podemos asegurar que el agente causal del daño de la lenticela este entre los microorganismos aislados. Es importante resaltar que nuestras observaciones deben ser consideradas con cuidado, considerando las limitaciones de nuestro trabajo. Es decir, la asociación entre la composición y la diversidad de las comunidades fúngicas con la severidad del daño de la lenticela de las UP no puede ser descartada y la existencia de una microflora típica del cultivo de *P. americana* cv. *Hass* no puede ser asegurada. Trabajos adicionales son necesarios para evaluar estas hipótesis. Entre las limitaciones de nuestro trabajo están el número de aislados el cual es bajo y la estrategia de aislamiento empleada la cual puede estar favoreciendo el aislamiento de ciertos taxones. Incrementar el número de aislados y emplear diferentes medios de cultivo con contenidos nutricionales variables podría incrementar el poder estadístico y favorecer el aislamiento de taxones más variables (Copetti et al., 2009; Francisco et al., 2006). Por otro lado, algunos de nuestros aislados no fueron incluidos en parte de los análisis que comparaban las diferencias entre las comunidades fúngicas aisladas pues fueron perdidos durante el almacenamiento o no pudieron ser identificados. Un caso particular es el de los individuos los dos individuos de los grupos morfológicos 5 y 6 con esporas semicilíndricas, melanizadas y septadas. Estos hongos, aunque no pudieron ser identificados, pertenecen probablemente al género *Alternaria* considerando la morfología de sus esporas. *Alternaria spp.*, ha sido aislado de *P. americana* cv. *Hass* y ha sido asociado a enfermedades como la roña junto a *Colletotrichum spp.* (Alfaro-Espino et al., 2017). Otro limitante de nuestros análisis es la metodología empleada para la asignación taxonómica la cual no permite evaluar la diversidad inter e intra-especies ya que los primers empleados (ITS1 e ITS4), aunque permiten la delimitación por género, no presentan una buena resolución a nivel de especie (Martin & Rygielwicz, 2005; Martín & Alvaro, 2001).

A pesar de estas limitaciones, nuestros resultados son de importancia pues aportan a nuestro entendimiento del daño de la lenticela de *P. americana* cv *Hass*. Nuevos géneros con potencial patogénico fueron encontrados además de los comúnmente asociados con este daño. Esto reafirma lo observado por estudios previos y aporta conocimiento nuevo. Este estudio da pie a futuros estudios en los que se evalúen algunas de las preguntas que surgieron durante este trabajo. ¿Existe una microflora común del cultivo de *P. americana* cv. *Hass* y otra variable que depende de las condiciones agroclimáticas de cada cultivo? ¿Qué implicaciones tienen esta microflora variable? ¿Existe una fase de latencia en el ciclo de vida del agente causal del daño de la lenticela que dificulta la replicación del daño in vitro? Futuras

evaluaciones que incluyan más sitios de muestreo y evaluaciones de patogenicidad en campo permitirán dar respuesta a algunas de estas preguntas.

5. Conclusiones

63 microorganismos fueron aislados a partir de frutos de *P. americana* cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela. Estos incluían cepas de los géneros *Phyllosticta* spp., *Nigrospora* spp., *Cytospora* spp., *Diaporthes* spp. y *Neurospora* spp. Entre los que *Colletotrichum* spp. fueron predominantes. Muchos de estos aislados mostraron un potencial patogénico al ser capaces de causar síntomas en frutos sanos de *P. americana* cv. Hass. Nuestros resultados no permiten concluir una asociación entre las severidades diferenciales del daño de la lenticela observadas en las UP y la composición y la diversidad de las comunidades fúngicas asociadas al daño de la lenticela. Nuestros resultados no mostraron una relación que permita asociar el daño del pedúnculo con el daño de la lenticela, sin embargo, no podemos descartar por completo esta asociación, debido a que cepas aisladas en pedúnculo pudieron causar infección en frutos.

6. Bibliografía

- Alfaro- Espino, E., Morales-Garcia, J. ., Pedraza-Santos, M. ., Chàvez-Bàrcenas, A. ., & Morales-Montelongo, K. . (2017). HONGOS ASOCIADOS AL SÍNDROME DE LA ROÑA DEL AGUACATE EN EL ESTADO DE MICHOACÁN, MEXICO. *Memorias Del V Congreso Latinoamericano Del Aguacte*, 181–189.
- Alkan, N., & Fortes, A. M. (2015). Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 6(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00889>
- Altschul, S. ., Gish, W., Miller, W., Myers, E. ., & Lipman, D. . (1990). BLAST PROGRAMS, Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*, 215, 403–410.
- Álvarez, S. P., Ávila, G., & Coto, O. (2015). Revisión bibliográfica EL AGUACATERO (*Persea americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 36, 111–123.
- Baayen, R. P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., Van der Aa, H. A., De Weerd, M., Van Brouwershaven, I. R., Schutte, G. C., Maccheroni, W., Glienke de Blanco, C., & Azevedo, J. L. (2002). Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Phytopathology*, 92(5), 464–477. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.5.464>
- Behr, M., Humbeck, K., Hause, G., Deising, H. B., & Wirsig, S. G. R. (2010). The hemibiotroph *colletotrichum graminicola* locally induces photosynthetically active green islands but globally accelerates senescence on aging maize leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(7), 879–892. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0879>
- Bernal, J. (2014). Manual tècnico, actualizaciòn tecnològica y buenas pràcticas agrìcolas (BPA) en el cultivo de aguacate. In *Journal of Chemical Information and Modeling*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- CODEX. (2013). CODEX STAN197. Código de alimentación: Norma de CODEX para el aguacate (*Persea americana*). *Organización de La Naciones Unidas Para La Agricultura y La Alimentación FAO*, 2–6. [file:///C:/Users/jlopezh/Downloads/CXS_197s \(4\).pdf](file:///C:/Users/jlopezh/Downloads/CXS_197s%20(4).pdf)
- Copetti, M. V., Santurio, J. M., Cavalheiro, A. S., Alves, S. H., & Ferreira, L. (2009). *Comparison of different culture media for mycological evaluation of commercial pet food*. 37(July), 329–335.
- Darvas, Jozsef, M. (1982). *Etiology and Control of Some Fruit Diseases of Avocado (Persea Americana Mill.) at Westfalia Estate*. 1974, 31–85.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2016). Cultivo del aguacate Hass (*Persea americana* Mill; *Persea nubigena* var. *Guatemalensis* x *Persea americana* var. *drymifolia*), plagas y enfermedades durante la temporada de lluvias. *Boletín Mensual Insumos y Factores Asociados a La Producción Agropecuaria.*, 50, 1–64. <http://www.lapatria.com/>
- Everett, K. ., Hallett, I. C., Yearsley, C., Lallu, N., & Pak, H. A. (2001). *Lenticel Damage*. 1(1993), 1–14.
- Everett, K., Hallett, I. C., Rees-George, J., Chynoweth, R. W., & Pak, H. A. (2008). Avocado lenticel damage: The cause and the effect on fruit quality. *Postharvest Biology and Technology*, 48(3), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.008>
- Fang, X., Qin, K., Li, S., Han, S., & Zhu, T. (2020). Whole genome sequence of *Diaporthe capsici*, a new pathogen of walnut blight. *Genomics*, 112(5), 3751–3761. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.04.018>
- Francisco, E. A., Mochi, D. A., & Monteiro, A. C. (2006). *Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi*. 6–9.
- Galindo-Tovar, M. ., & Arzate-Fernández, A. . (2010). Consideraciones sobre el origen y primera dispersión del aguacate (*Persea americana*, Lauraceae). *Cuadernos de Biodiversidad*, 11–15.
- Granados Pérez, W., & Valencia Rincón, J. C. (2018). Indicadores e instrumentos monetarios. *MINAGRICULTURA, unknown*, 167–194. <https://doi.org/10.17533/udea.le.n52a4904>
- Hynes, M. J. (2003). The *Neurospora crassa* genome opens up the world of filamentous fungi. *Genome Biology*, 4(6), 4–7. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-6-217>
- INTAGRI. (2017). Antracnosis en el Cultivo de Aguacate. *Serie Fitosanidad*, 81.
- Liao, Y. ., & Wang, Z. . (2020). First Report of *Phyllosticta capitalensis* Causing Black Spot Disease on *Psidium*. *Disease Notes*.
- Martin, K. J., & Rygielwicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology*, 11, 5–28. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>
- Martin, M. P., & Alvaro, I. (2001). Notas preliminares sobre las técnicas de amplificación y variación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) en el género *Encalypta* (Encalyptaceae, Bryophyta). *Botanica Complutensis*, 25, 233–239.
- Miller, P. (1768). *The gardeners dictionary*. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/394481#page/1/mode/1up>
- Milne, D. L. (1998). Avocado Quality Assurance: Who? Where? When? How? *South African Avocado Growers' Association*, 21, 39–47.
- Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Holland, L. A., Doll, D. A., Kallsen, C. E., Culumber, C. M., & Trouillas, F. P. (2019). Identification and pathogenicity of fungal species associated with canker diseases of pistachio in California. *Plant Disease*, 103(9), 2397–2411. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1717-RE>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, R. P., O’Har, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., H. Stevens, M. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2020). *vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.5-7. <https://cran.r-project.org/package=vegan>

- Pelczar, M. J., Pelczar, R. M., Shurtleff, M. C., & Kelman, A. (2020). Plant disease. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/plant-disease>. Accessed 23 April 2021.
- Perkins, D. D., & Davis, R. H. (2000). Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5107–5109. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5107-5109.2000>
- Ramírez-Gil, J. G., López, J. H., & Henao-Rojas, J. C. (2020). Causes of Hass Avocado Fruit Rejection in Preharvest, Harvest, and Packinghouse: Economic Losses and Associated Variables. *Agronomy*, 10.
- Reina Noreña, J., Mayorga-Cobos, M. J., Caldas-Herrera, Stefanny Julieth Rodríguez-Valenzuela, J., & Varón-Devia, E. H. (2015). El problema de la peca en cultivos de aguacate (*Persea americana* Mill.) del norte del Tolima, Colombia. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 16(2), 265–278. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v16n2/v16n2a09.pdf>
- Renner, S. S. (2004). Variation in diversity among Laurales, Early Cretaceous to present. *Biol. Skr.*, 55(2), 441–458. <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=1QwCQFbPsa4C&oi=fnd&pg=PA441&dq=Variation+in+diversity+among+Laurales,+Early+Cretaceous+to+Present&ots=oMtC57lBAS&sig=KdPeWVBoQQnpuj9SiSExNJb5UE>
- Ríos, M. (2010). *Control biológico de la Antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides Penz) en tomate de árbol (Solanum betaceum) en el ecotipo: amarillo puntón, mediante hongos endofitos antagonistas*. 104.
- Rodríguez-López, E., González-Prieto, J., & Mayek-Pérez, N. (2009). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 53–63.
- Rodríguez-López, E. S., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Delgado, S., Gutiérrez-Diez, A., & Mayek-Pérez, N. (2013). Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(3), 898–905. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000300029>
- Sandoval-Sánchez, M., Nieto-Ángel, D., Sandoval-Islas, J. S., Téliz-Ortiz, D., Orozco-Santos, M., & Silva-Rojas, H. V. (2013). Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera Indica* L.). *Agrociencia*, 47(1), 61–73.
- Schaffer, B., Wolstenholme, N. B., & Whaley, A. W. (2013). *The avocado botany, production and uses*.
- Schonenberger, J. (1999). Floral structure, development and diversity in *Thunbergia*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 1(36), 35.
- Scortichini, M. (2010). Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. *Journal of Plant Pathology*, 92(1 SUPPL.), 73–78. <https://doi.org/10.4454/jpp.v92i1sup.2508>
- Sharma, M., & Kulshrestha, S. (2015). *Colletotrichum gloeosporioides*: un patógeno causante de antracnosis de frutas y verduras. *Biosci Biotechnol Res Asia*.
- Sharma, P., Meena, P. D., & Chauhan, J. S. (2013). First Report of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch Causing Stem Blight on Brassica juncea in India. *Journal of Phytopathology*, 161(6), 439–441. <https://doi.org/10.1111/jph.12081>
- Sherafati, F., Khodaygan, P., Azadvar, M., Sedaghati, E., Saberi-Riseh, R., & Baghaee-Ravari, S. (2014). Association of *Pantoea agglomerans* with the citrus bacterial canker disease in Iran. *Journal of Crop Protection*, 3(3), 345–355.
- Siddiq, M., Ahmed, J., Lobo, M. G., & Ozadali, F. (2012). Tropical and subtropical fruits Postharvest physiology, processing and packaging. In *Stewart Postharvest Review*. <https://doi.org/10.2212/spr.2009.5.5>

- Smith, C. O. (1925). Blast of Avocados — a Bacterial Disease. *California Avocado Association Annual Report*, 26, 72–74.
- Stensvand, A. (2017). Overwintering Diseased Plant Parts and Newly Infected Flowers and Fruit as Sources of Inoculum for *Colletotrichum acutatum* in Sour Cherry. *Plant Disease*, 101, 1207–1213. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-16-1599-RE>
- Tamayo Molano, J. P. (2007). Enfermedades del Aguacate. *Politecnica*, 4(4), 51–70. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.8.2007>
- Toh, W. ., Loh, P. ., & Wong, H. . (2014). First report of leaf blight of rice caused by *Cochliobolus lunatus* in China. *Plant Disease*, 98(5), 686. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0303-PDN>
- Trinidad-Àngel, E., Ascencio-Valle, F. de J., Ulloa, José A., Ramírez-Ramírez, J. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderon-Santoyo, M., & Bautista Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México* Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose in avocado Nayarit, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3953–3964.
- Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A., & Hyde, K. D. (2011). The genus *Phomopsis*: Biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, 50, 189–225. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0126-9>
- Walters, D. R., McRoberts, N., & Fitt, B. D. L. (2008). Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. *Biological Reviews*, 83(1), 79–102. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00033.x>
- Wang, M., Liu, F., Crous, P. W., & Cai, L. (2017). Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 39(December), 118–142. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.06>
- Zamora-Magdaleno, T., Cárdenas-Soriano, E., Cajuste-Bontemps, J., & Colinas-León, M. teres. (2001). Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. EN FRUTO DE AGUACATE ‘HASS.’ *Agrociencia*, 35(2), 237–244.

Tabla Anexo 1

Tabla 5: organismos tipos utilizados y número de accesión, utilizados en la construcción del mapa filogenético.

Aislado	Accesión	Referencia
Glomerella acutata IMI 117617	AF411700.	Canon et al. - 2012
Colletotrichum acutatum CBS 112996	JQ005776.1	
Colletotrichum horii C1180	GQ329690.1	
Colletotrichum gloeosporioides IMI 356878	EU371022.1	
Colletotrichum gloeosporioides CBS112999	JQ005152	
Colletotrichum fructicola ICMP18581	JX010165	
Colletotrichum fructicola BPD116	FJ972603	
Colletotrichum siamense BPD12	FJ972613	
Colletotrichum siamense ICMP18578	JX010171	
Colletotrichum tropicale 5101	GU994331,	
Colletotrichum tropicale CBS 124949	JX010264	
Bipolaris maydis CBS136.29	KJ909769	Manamgoda et al. - 2014
Bipolaris maydis CBS 137271	AF071325	
Bipolaris sacchari ICMP 6227	KJ922386.1	
Bipolaris zeae AR3795	KJ909786	
Bipolaris zeicola AR5166	KJ909788	
Bipolaris sorokiniana CBS120.24	KJ909776	
Cytospora sorbicola MFLUCC 16-0584	KY417755	Lawrence et al., 2018
Cytospora sorbi MFLUCC 16-0631	KY417752	

Cytospora atrocirrhatta HMBF156	KF225610.1	
Cytospora valsoidea CMW 4309	AF192312	
Diaporthe benedicti SBen914	KM669929	
Diaporthe ampelina Wolf912	KM669964	
Phyllosticta capitalensis CBS 173.77	KF206179.	Wikey et al. - 2013
Phyllosticta capitalensis CBS 128856	JF261465.1	
Phyllosticta citricarpa CBS 127454	JF343583.	
Phyllosticta braziliana LGMF330	JF343572	
Phyllosticta hypoglossi CBS 434.92	FJ538367	
Neurospora crassa FGSC 987	AF388914.1	Dettman et al., 2001
Neurospora africana FGSC 1740	AF388913	
Neurospora terricola FGSC 1889	AF388928	
Gelasium calospora FGSC 958	AF388931	
Nigrospora sphaerica LC2705	KX985952	Wang et al. - 2017
Nigrospora oryzae LC6760	KX986055	
Nigrospora chinensis CGMCC3.18127	KX986023	
Pseudocercospora purpurea CBS:114163	GU269783	Crous et al. - 2013
Pseudocercospora fijiensis CBS 120258	EU514248	
Entonaema liquescens agtS279	AY616686	Bitzer et al., 2008
Daldinia eschscholtzii agtS384	AY616684	
Daldinia concentrica agtS396	AY616683	
Daldinia caldariorum	AM749934	
Diaporthe alleghaniensis CBS 495.72	FJ889444	

Diaporthe citri AR3405	KC843311.1	Udayanga et al. - 2014
Diaporthe celastrina CBS 139.27	KC343047	
Diaporthe cotoneastri CBS 439.82	FJ889450.1	

Tabla Anexo 2

Tabla 6: Caracterización e identificación de los microorganismos aislados a partir lenticelas sintomáticas y pedúnculos necrosados de Frutos de Persea americana cv. Hass con síntomas típicos del daño de la lenticela -Fruto

Cepa	Unidad productiva	Tejido de aislamiento	Grupo morfológico	Morfología de espora	Asignación taxonómica	Producción de síntomas
EAFIT-F0001	Sinaí	pedúnculo	Grupo 1		<i>Neurospora sp.</i>	
EAFIT-F0002	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 4		<i>Entonaema sp.</i>	
EAFIT-F0003	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 2	Tipo 1		
EAFIT-F0004	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 2		<i>Bipolaris sp.</i>	
EAFIT-F0005	Sinaí	Pedúnculo				
EAFIT-F0006	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 7		<i>Nigrospora sp.</i>	
EAFIT-F0007	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 2	Tipo 1		
EAFIT-F0008	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 3		<i>Diaporthe sp.</i>	
EAFIT-F0009	Sinaí	Fruto	Grupo 4	Tipo 1	<i>Diaporthe sp.</i>	

EAFIT-F0010	Sinaí	Fruto	Grupo 6		<i>Phyllosticta sp.</i>	
EAFIT-F0011	Sinaí	Fruto	Grupo 6		<i>Phyllosticta sp.</i>	Islas verdes, crecimiento micelio blanco, lenticelas pequeñas *
EAFIT-F0012	Sinaí	Fruto	Grupo 4	Tipo 1	<i>Colletotrichum sp.</i>	Crecimiento de micelio blanco, lenticelas pequeñas, generación de necrosis*
EAFIT-F0013	Sinaí	Fruto	Grupo 6		<i>Phyllosticta sp.</i>	
EAFIT-F0014	Sinaí	Fruto	Grupo 4	Tipo 1	<i>Colletotrichum sp.</i>	
EAFIT-F0015	Sinaí	Fruto	Grupo 2	Tipo 1		Islas verdes
EAFIT-F0016	Sinaí	Fruto	Grupo 1			
EAFIT-F0017	Sinaí	Fruto	Grupo 5		<i>Colletotrichum sp.</i>	
EAFIT-F0018	Sinaí	Fruto	Grupo 2	Tipo 1	<i>Colletotrichum sp.</i>	Islas verdes, crecimiento de micelio blanco*
EAFIT-F0019	Sinaí	Fruto	Grupo 2	Tipo 1	<i>Colletotrichum sp.</i>	Crecimiento de micelio blanco, islas verdes, generación de necrosis*
EAFIT-F0020	Sinaí	Fruto	Grupo 2	Tipo 1	<i>Colletotrichum sp.</i>	
EAFIT-F0021	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 2	Tipo 1		
EAFIT-F0022	Sinaí	Fruto	Grupo 2	Tipo 1	<i>Colletotrichum sp.</i>	
EAFIT-F0023	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 3			Crecimiento de micelio blanco, islas verdes*
EAFIT-F0024	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 1		<i>Nigrospora sp.</i>	
EAFIT-F0025	Sinaí	Pedúnculo				Micelio blanco, Islas verdes
EAFIT-F0026	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 2	Tipo 1	<i>Neurospora sp.</i>	

EAFIT-F0027	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 3		
EAFIT-F0028	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 1	<i>Diaporthe sp.</i>	
EAFIT-F0029	Sinaí	Pedúnculo	Grupo 5	Tipo 2	Isla verde*
EAFIT-F0030	Sinaí	hoja	Grupo 3	Tipo 3	Micelio blanco
EAFIT-F0031	Escondida	Fruto	Grupo 2	<i>Colletotrichum sp.</i>	
EAFIT-F0032	Escondida	Pedúnculo	Grupo 1	<i>Neurospora sp.</i>	
EAFIT-F0033	Escondida	Fruto			
EAFIT-F0034	Escondida	Fruto	Grupo 5	<i>Colletotrichum sp.</i>	
EAFIT-F0035	Escondida	Fruto	Grupo 3	<i>Cytospora sp.</i> - <i>Diaporthe sp.</i>	
EAFIT-F0036	Escondida	Pedúnculo	Grupo 5	<i>Colletotrichum sp.</i>	Islas verdes, crecimiento de micelio blanco, lenticelas pequeñas*
EAFIT-F0037	Escondida	Fruto	Grupo 5	<i>Colletotrichum sp.</i>	
EAFIT-F0038	Escondida	Fruto	Grupo 1	<i>Neurospora sp.</i>	Islas verdes*
EAFIT-F0039	Escondida	Pedúnculo	Grupo 1	<i>Neurospora sp.</i>	
EAFIT-F0040	Escondida	Fruto			
EAFIT-F0041	Escondida	Fruto	Grupo 1	<i>Neurospora sp.</i>	Micelio blanco
EAFIT-F0042	Escondida	Fruto	Grupo 1	<i>Cf. Cytospora</i>	
EAFIT-F0043	Escondida	Pedúnculo		<i>Nigrospora sp.</i>	
EAFIT-F0044	Escondida	Fruto			
EAFIT-F0045	Escondida	Pedúnculo	Grupo 6	<i>Bipolaris sp.</i>	Islas verdes, crecimiento de micelio blanco*

EAFIT-F0046	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Cf. Cytospora</i>	
EAFIT-F0047	Escondida	Fruto	Grupo 3			
EAFIT-F0048	Escondida	Pedúnculo	Grupo 7		<i>Daldinia sp.</i>	
EAFIT-F0049	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Colletotrichum sp.</i>	Islas verdes, crecimiento de micelio blanco*
EAFIT-F0050	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Colletotrichum sp.</i>	
EAFIT-F0051	Escondida	Fruto				
EAFIT-F0052	Escondida	Fruto	Grupo 3		<i>Cytospora sp.</i>	Micelio blanco*
EAFIT-F0053	Sinaí	Fruto	Grupo 4	Tipo 2		Islas verdes
Bacterias						
EAFIT-B0001	Sinaí	Fruto	Grupo 2		<i>Paenibacillus sp.</i>	
EAFIT-B0002	Sinaí	Fruto	Grupo 2		<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	
EAFIT-B0003	Sinaí	Fruto	Grupo 2		<i>Pseudomona sp.</i>	
EAFIT-B0004	Sinaí	Fruto	Grupo 1		<i>Pantoea sp.</i>	
EAFIT-B0005	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Bacillus sp.</i>	
EAFIT-B0006	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Pantoea sp.</i>	
EAFIT-B0007	Escondida	Fruto	Grupo 1			
EAFIT-B0008	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Pantoea sp.</i>	
EAFIT-B0009	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Pantoea sp.</i>	
EAFIT-B0010	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Pantoea sp.</i>	
EAFIT-B0011	Escondida	Fruto	Grupo 1		<i>Pantoea sp.</i>	

* Aislados seleccionados y considerados más patogénicos al causar alguna afectación de manera recurrente.

