

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática: Interacción Planta-Microorganismo-Insecto



**FACULTAD DE
AGROBIOLOGÍA**

“PRESIDENTE JUÁREZ”



Tesis:

**Identificación molecular y caracterización
morfológica de *Sphaceloma perseae* en la franja aguacatera de
Michoacán**

Como requisito para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta:

MARIELA CORREA SUÁREZ

Tutor:

Doctor en Ciencias Agrícolas

SALVADOR OCHOA ASCENCIO

Uruapan, Michoacán

Agosto 2019



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

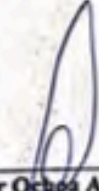
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Identificación molecular y caracterización morfológica de *Sphaceloma perseae* en la franja aguacatera de Michoacán" presentado por la ING. AGRÓNOMA MARIELA CORREA SUÁREZ con Número de Matrícula 0853679E, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, a 09 de mayo de 2019

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA



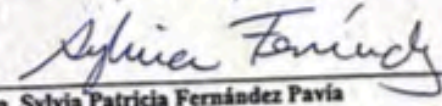
Dr. Salvador Ochoa Ascencio



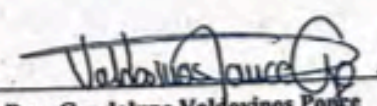
Dr. Gerardo Vázquez Marrufo



Dr. Héctor Guillén Andrade



Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavia



Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

Y ciertamente llegará a ser como un árbol plantado al lado de corrientes de agua, que da su propio fruto en su estación y cuyo follaje no se marchita, y todo lo que haga tendrá éxito.

Salmos 1:3

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme tanto.

A mis papás Efraín Correa García y Ma Carmen Suárez Medrano por su apoyo incondicional y su amor infinito, jamás podré pagar lo mucho que me dan.

Al Dr. Salvador Ochoa mi asesor, mi maestro gracias por todo, siempre le estaré agradecida por todo su tiempo y dedicación. Mi cariño y admiración.

A los DOCTORES. Sylvia Fernández Pavía, Guadalupe Valdovinos Ponce, Gerardo Vázquez Marrufo y Héctor Guillén Andrade por todas las enseñanzas, por todo el apoyo brindando, fueron pieza clave para que este proyecto fuera posible.

A Manuela Ángel, mi compañera de laboratorio, quien se convirtió en una amiga entrañable, gracias, Manu por siempre estar y por enseñarme tanto.

A Mariela Reyes, por todo tu invaluable apoyo. Gracias

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por las facilidades para desarrollar esta presente investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
RESUMEN	8
SUMMARY	9
I. INTRODUCCIÓN	10
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Área de estudio y colecta de muestras	25
3.2 Aislamiento	26
3.3 Extracción de ADN	27
3.4 Amplificación del interespaciador transcrito de rDNA (ITS)	27
3.5 PCR con iniciadores específicos para <i>S. perseae</i>	28
3.6 Caracterización morfo-fisiológica de los aislados obtenidos	28
3.7 Análisis estadístico	29
IV. RESULTADOS	30
4.1 Aislamiento	30
4.2 Identificación molecular	33
4.3 Caracterización morfo-fisiológica	36
4.3.1 Crecimiento de la colonia de <i>Sphaceloma perseae</i>	38
4.3.2 Tasa de Crecimiento	41
4.3.3 Textura y color de <i>Sphaceloma perseae</i>	45
V. DISCUSIÓN	50
VI. CONCLUSIÓN	55
VII. LITERATURA CITADA	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Características climáticas de cinco zonas agroecológicas de Michoacán en donde se cultiva aguacate.	25
2. Números de aislados y tipos de lesiones de donde de aisló <i>S. perseae</i> en cada zona agroecológica de Michoacán.	31
3. Identificación molecular de aislados obtenidos a partir de síntomas de roña en fruto y pedúnculo en cinco zonas agroclimáticas de la región aguacatera de Michoacán. La identificación se realizó por PCR con los iniciadores SpF5/SpR6.	34
4. Efecto de dos medios de cultivo y dos temperaturas en el crecimiento (mm) de 26 morfotipos de <i>Sphaceloma perseae</i> . Los valores representan la media de tres repeticiones. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).	39
5. Efecto de dos medios de cultivo y dos temperaturas en la tasa de crecimiento (mm/día) de 26 morfotipos de <i>Sphaceloma perseae</i> . Los valores representan la media de tres repeticiones. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).	43
6. Medias de tasa de crecimiento de colonias (mm/día) de 26 morfotipos de <i>S. perseae</i> en dos medios de cultivo y dos temperaturas. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).	45
7. Características morfo-fisiológicas de 26 morfotipos de <i>Sphaceloma perseae</i> obtenidas en dos medios de cultivo y dos temperaturas.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Síntomas característicos de especies de <i>Sphaceloma</i> . (A) <i>S. ampelina</i> (foto Fan <i>et al.</i> , 2017), (B, C) <i>S. fawcettii</i> en fruto y hoja respectivamente (foto: Paul Fourie, S. Africa), (D) <i>S. phaseoli</i> (foto: Deidre Fourie, South Africa), (E) <i>S. punicae</i> . (foto: M. Mirabolfathy, Iran).	18
2. Síntomas de <i>Sphaceloma perseae</i> en fruto de aguacate (foto: Fan <i>et al.</i> , 2017).	20
3. Colonias de <i>Elsinoe</i> spp. en EMA después de 3 semanas. (A) <i>Elsinoe asclepiadea</i> , (B) <i>Elsinoe australis</i> , (C) <i>Elsinoe veneta</i> , (fotos: Fan <i>et al.</i> , 2017).	22
4. Zonas agroecológicas determinadas para 22 municipios de la franja aguacatera de Michoacán, México (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2010).	26
5. Forma y aspecto de la lesión de roña en. (A) Pedúnculo, (B) Fruto, (C) Parte apical del fruto, (D) Parte frontal del fruto. Nótese el borde de la lesión, la elevación y el color del centro.	30
6. Colonias de <i>S. perseae</i> obtenidas de cinco diferentes zonas agroecológicas (I, III, VII, VIII, IX) de Michoacán, después de 21 semanas de incubación en PDA a 25 °C. Barra de escala: 10 mm.	32
7. Productos de PCR de muestras de <i>S. perseae</i> amplificados con los iniciadores SpF5/SpR6. (MM) Marcador molecular de 100 pb. (+) Testigo positivo.	33
8. Morfotipos utilizados en la caracterización morfo-fisiológica de <i>S. perseae</i> .	37
9. Crecimiento (mm) de 26 morfotipos de <i>Sphaceloma perseae</i> en dos medios de cultivo y dos temperaturas. Los puntos representan la media de crecimiento de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar.	39
10. Efecto de la interacción morfotipo:medio de cultivo:temperatura en el crecimiento de colonia (mm) de 26 morfotipos de <i>Sphaceloma perseae</i> . Los puntos representan la media de tres repeticiones.	41
11. Tasa de crecimiento (mm/día) de 26 morfotipos de <i>Sphaceloma perseae</i> en dos medios de cultivo y dos temperaturas. Los puntos representan la media de la tasa de crecimiento de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar.	42
12. Efecto de la interacción morfotipo: medio de cultivo: temperatura en el crecimiento de colonia (mm) de 26 morfotipos de <i>Sphaceloma perseae</i> . Los puntos representan la media de tres repeticiones.	44
13. Texturas de <i>Sphaceloma perseae</i> en PDA y EMA después de 8 semanas. (A) Coraloide, (B) Glutinosa, (C) Coremia, (D) Farinosa, (E) Doble textura.	46
14. Colonias de <i>Sphaceloma perseae</i> en dos medios cultivo a 21 °C y 25 °C después de 8 semanas.	48

RESUMEN

La roña es una enfermedad que afecta los frutos y hojas jóvenes del aguacate (*Persea americana* Mill). En el fruto, las lesiones son elevadas de color púrpura o marrón a casi negro y de 3 a 10 mm de diámetro, con frecuencia en patrón circular con un margen irregular. Las lesiones aparecen inicialmente dispersas y cuando se unen forman una región corchosa con fisuras marrones, que rompen la epidermis y producen una densa cubierta afelpada de conidióforos y conidios hialinos. En hojas la infección ocurre en las superficies adaxial y abaxial en forma de lesiones afelpadas circulares, que se desprenden y forman pequeñas perforaciones con borde corchoso. La roña del aguacate es causada por el hongo *Sphaceloma perseae* Jenkins y está presente en países productores de aguacate en África, Asia y América. En México, se reporta como una enfermedad de amplia distribución y su impacto principal es sobre la apariencia del fruto que limita su aceptabilidad en el mercado, más que en la productividad del cultivo. El objetivo del presente trabajo fue la identificación molecular y caracterización morfológica de *Sphaceloma perseae* a partir de aislados obtenidos de frutos de aguacate con síntomas de roña, procedentes de cinco regiones agroecológicas de la franja aguacatera de Michoacán. Se obtuvieron 450 aislados a partir de lesiones iniciales en frutos de cuatro meses de edad, de los cuales 112 aislados fueron confirmados como *Sphaceloma perseae* mediante PCR con el uso de iniciadores específicos para esta especie SpF5 (GACCGAACCAACTCTTGAC) y SpR6 (CCACACGCCCAATACCAA). Los 112 aislados fueron agrupados por similitud morfológica en 26 morfotipos y caracterizados bajo condiciones de crecimiento en dos medios de cultivo (PDA y EMA) y dos temperaturas de incubación (21 y 25 °C). Los resultados obtenidos indican que *S. perseae* presenta un lento crecimiento en medio de cultivo y que los morfotipos exhiben una amplia variación en tamaño, forma, textura y color de colonia.

Palabras clave: *Elsinoe*, *Persea americana*, roña, aislamiento, ITS.

SUMMARY

The avocado scab is a disease that affects young fruits and leaves of avocado (*Persea americana* Mill). On fruits, the lesions have a circular pattern of 3-10 mm diameter with an irregular margin. These lesions have a purple-brown coloration. Initially, the lesions are scattered that develops a corky texture resulting in the rupture of the epidermis and may produce a mass of conidiophores and hyaline conidia. On leaves, the infection occurs on the adaxial and abaxial surfaces in the form of circular lesions that produces small perforations with a corky edge. The scab is caused by the fungus *Sphaceloma perseae* Jenkins and it is present in avocado producing countries in Africa, Asia and America. In Mexico, it is reported as a disease with wide distribution and the main impact is the appearance of the fruit that limits its acceptability in the market. The main objective of this study was the molecular identification and morphological characterization of different isolates of *Sphaceloma perseae* obtained from different avocado fruits with symptoms of scab. These isolates were obtained from five agro-ecological regions of avocado in Michoacan. Four hundred and fifty isolates were obtained from initial lesions of four-month-old fruits, from which 112 isolates were confirmed as *Sphaceloma perseae* by PCR with the use of specific primers, SpF5 (GACCGAACCAACTCTTGAC) and SpR6 (CCACACGCCCAATACCAA), for this fungus. One hundred and twelve isolates were grouped by morphological similarity in 26 morphotypes and characterized under growth conditions in two culture media, PDA and EMA, and two incubation temperatures, 21 and 25 °C. The results that we obtained indicate that isolates of *S. perseae* has a slow growth in culture medium and the morphotypes have a wide variation in colony size, shape, texture and color.

Key words: *Elsinoe*, *Persea americana*, scab, isolation, ITS.

I. INTRODUCCIÓN

La roña del aguacate (*Persea americana* Mill.) causada por *Sphaceloma perseae* es una enfermedad de amplia distribución en las zonas productoras de aguacate de México. Afecta los frutos y hojas jóvenes, llegando a ser un problema importante en regiones con humedad relativa alta (Woo *et al.*, 2004). En el fruto, la roña se presenta en forma de lesiones marrón a casi negras, circulares de 3 a 10 mm de diámetro, con margen irregular, elevadas y que cuando se unen forman una región corchosa con fisuras marrones (Jenkins 1925a; Jenkins 1934; Everett *et al.*, 2010), que deterioran su apariencia y facilitan el acceso de otros organismos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Burnett, 1974). Las lesiones aparecen dispersas en el fruto, pero con frecuencia se unen y forman una superficie irregular extendida que puede llegar a cubrir toda la superficie del fruto (Burnett, 1974; Palmateer, 2006). En frutos de un mes de edad, la lesión rompe la epidermis y produce conidióforos y conidios hialinos que forman una densa cubierta afelpada de color olivo oscuro (Jenkins, 1934). La capa afelpada se pierde poco a poco por efecto de la intemperie hasta que sólo unos pocos conidióforos permanecen en el fruto de hasta cuatro meses de edad (Jenkins, 1934). En las hojas, la infección ocurre en la parte superior de la copa de los árboles, principalmente en la nervadura central de la superficie abaxial (Jenkins 1925a; Jenkins 1934); las lesiones son café-rojizas, con borde amarillo; con frecuencia el centro de la lesión se desprende dando lugar a perforaciones con el borde suberizado (Pernezny y Marlatt, 2007).

La roña del aguacate se reportó por primera vez en un vivero de aguacate en Florida en 1918 (Stevens, 1918). Se ha registrado en África (Guinea, Marruecos, Sudáfrica, Zambia y Zimbabwe), Asia (Filipinas, Taiwán), Centro América y las Indias Occidentales (Antillas, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Haití, Honduras, Jamaica, Nicaragua, Panamá y Puerto Rico) y en América del Sur (Argentina, Brasil, Guyana, Perú, Venezuela), (Everett, 2008). En México, se reporta como una enfermedad de amplia distribución (Téliz y Mora, 2007; GIIIA, 2013) y su impacto principal es sobre la apariencia del fruto y su aceptabilidad en el mercado, más que en la producción del cultivo.

Aún cuando los síntomas de la roña se reconocen con facilidad, el aislamiento de *S. perseae* no es sencillo, ya que el micelio que se desarrolla en los tejidos infectados invade solo de forma sub-epidermal (Jenkins, 1934) y con frecuencia *Colletotrichum* penetra como invasor secundario. Para obtener aislados de *Sphaceloma* es necesario utilizar medios de cultivo semi

selectivos y ser muy cuidadoso con el tipo de muestra a partir de la cual se pretenda obtener el aislamiento (Crous *et al.*, 2009). El crecimiento de *S. perseae* en medio sintético es lento y da lugar a colonias afelpadas, elevadas, de bordes irregulares, de aspecto rugoso y color rosado a beige claro (Everett *et al.*, 2010). Aún y cuando la roña del aguacate se reporta con frecuencia en Michoacán, su diagnóstico está basado únicamente en los síntomas; esto puede dar lugar a confusiones debido a que otros factores bióticos como la raspadura de los trips o abióticos como el rozamiento de frutos, pueden producir daños similares.

En los últimos años se han observado síntomas severos de roña tanto en aguacate Hass, como en aguacate variedad Carmen. La severidad de estos síntomas en etapas tempranas de desarrollo del fruto ha hecho difícil el manejo de la enfermedad. Adicionalmente, en el sector aguacatero se presentan confusiones sobre la causa de la enfermedad, ya que en las infecciones iniciales la enfermedad es denominada ‘mancha de chapopote’ por el aspecto de la lesión que es oscura, pequeña y elevada. Sin embargo, con el tiempo, la lesión evoluciona hacia el típico síntoma de roña; cuando esto sucede, el aislamiento del patógeno es difícil y el control de la enfermedad poco efectivo. Derivado de estos síntomas, nuevos para la región, mucho se ha especulado sobre el agente causal, sin embargo y de acuerdo con Everett (2010), la forma y desarrollo de las lesiones corresponden claramente con los síntomas descritos por Jenkins (1934) y resultan muy similares a los síntomas conservados en las muestras de referencia a partir de los cuales la etiología de la enfermedad fue establecida. Partiendo de estos hechos, los síntomas que implican la formación de lesiones corchosas y agrietadas tanto en la epidermis del fruto como en los pedúnculos corresponden a la enfermedad denominada roña, que de acuerdo con múltiples reportes es causada por *Sphaceloma perseae*.

Diferentes trabajos se han desarrollado en la franja aguacatera de Michoacán (Morales, 2000; Morales, 2017; Ávila *et al.*, 2003; Marroquín, 1999), sin embargo, no abordan el aislamiento del agente causal y la descripción que presentan del patógeno no corresponde con las características descritas por Jenkins (1934), Everett (2010) y Fan *et al.*, (2017). La ausencia en México de un cultivo tipo que pueda ser utilizado como referencia, contribuye a la confusión sobre la etiología de la roña del aguacate. Adicionalmente, cuando se intenta realizar aislados, se obtienen frecuentemente cepas de otras especies de hongos, secundarios a la infección.

Algunos reportes incluso ponen en duda la presencia de *S. perseae* en Michoacán (Robles *et al.*, 2014; Espino *et al.*, 2017)

Información no publicada de Ochoa y Ploetz (2014) indican que a partir de lesiones iniciales de la llamada ‘mancha de chapopote’, se obtienen colonias del tipo *Sphaceloma* y que estas muestran una tasa de crecimiento baja, siendo notoriamente visible la colonia hasta dos meses después de la siembra

La identificación del agente causal de una enfermedad es fundamental para entender el proceso patológico, determinar las diferencias en la expresión de síntomas y comprender las interacciones hospedero-patógeno-ambiente. Desde el punto de vista agronómico, la etiología de una enfermedad aporta elementos fundamentales para establecer los principios de manejo y control. Este es el principio en donde se soporta el estudio de las enfermedades de las plantas.

El presente trabajo se realizó con los objetivos de aislar, identificar molecularmente y caracterizar morfológicamente a *Sphaceloma perseae* en el cultivo de aguacate en la franja aguacatera de Michoacán.

HIPÓTESIS

Sphaceloma perseae está presente en el cultivo de aguacate en la franja aguacatera de Michoacán, asociada al síntoma de roña del fruto.

OBJETIVOS

1. Obtener aislados en cultivo axénico de *Sphaceloma perseae* a partir de frutos de aguacate con síntomas iniciales de roña, procedentes de huertos comerciales de la franja aguacatera de Michoacán.
2. Identificar molecularmente aislados de *S. perseae* obtenidos.
3. Determinar las características culturales de *Sphaceloma perseae* en distintas condiciones de incubación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass, es uno de los cultivos más importantes en México por el valor comercial que representa, derivado de la apertura de diferentes mercados internacionales que ha permitido incrementar su exportación, principalmente hacia los Estados Unidos de América (EUA). A nivel nacional la superficie sembrada de aguacate en 2016 fue de 203,732 ha, con 178,706 ha cosechadas, y una producción de 1.88 millones de t, de las cuales el 77.5 % la aportó el estado de Michoacán (SIAP, 2017).

Con respecto a las exportaciones de aguacate mexicano a EUA, éstas se han incrementado a una tasa del 21.4 % anual en los últimos 10 años. Solo en la temporada de cosecha 2015-2016 se exportaron 859,000 ton, lo que representó un incremento del 25 % respecto a la temporada 2013-2014 (Info Hass, 2016). Adicionalmente, el 10 % de la producción total se destina para la exportación a otros mercados como Canadá, Japón y varios países de Asia, Europa y Centro América (Info Hass, 2016). Para cumplir con los estándares de calidad del fruto, la cadena productiva debe manejar adecuadamente los problemas ocasionados por plagas y enfermedades a nivel de huerto, así como realizar una eficiente selección y manejo de fruta a nivel de empaque.

Uno de los patógenos más importantes que afectan al fruto de aguacate es *Sphaceloma perseae*, agente causal de la enfermedad conocida como roña, la cual afecta la calidad externa de los frutos y limita su comercio internacional. La roña del aguacate fue descrita por primera vez en Florida en 1918 (Jenkins, 1934a) y hoy día se reporta en prácticamente todas las regiones productoras de aguacate en el mundo (Everett *et al.*, 2010).

Sphaceloma representa la forma asexual de *Elsinoe*, género perteneciente al orden Myriangiales, de la familia Elsinoaceae (Horst, 2013). Todos los miembros de *Elsinoe* (anamorfo=*Sphaceloma*) son fitopatógenos que causan enfermedades en cultivos de importancia económica como aguacate, yuca, cítricos, vid, flores ornamentales, entre otros. (Fan *et al.*, 2017). Las enfermedades causadas por especies de *Sphaceloma* se caracterizan por un sobre crecimiento de tejido. Cuando se acentúa esta hiperplasia, la enfermedad generalmente se llama sarna o roña mientras que cuando el crecimiento excesivo es apenas perceptible, simplemente un borde ligeramente elevado alrededor de un centro necrótico, la enfermedad se conoce comúnmente como antracnosis (Horst, 2013). Sin embargo, el uso del término

antracnosis para denominar enfermedades causadas por *Elsinoe* es confuso, debido a su empleo mucho más amplio para las enfermedades causadas por *Colletotrichum*. La antracnosis puntual fue un nombre alternativo recomendado por Jenkins (1947) para diferenciar una enfermedad causada por *Sphaceloma* de la antracnosis causada por *Colletotrichum* y del tipo de enfermedades de la costra que ocasiona *Venturia* (Horst, 2013).

Las principales enfermedades de importancia económica causadas por *Elsinoe* o *Sphaceloma* son: la roña del aguacate por *E. perseae*, la roña de los cítricos causada por *E. fawcettii* y *E. australis*, la roña del frijol causada por *E. canavaliae* y *E. phaseoli*, la antracnosis de la uva causada por *E. ampelina* y la súper elongación de la mandioca causada por *Sphaceloma manihoticola* (Jenkins, 1925b; Shear, 1929; Jenkins, 1931; Bruner y Jenkins, 1933; Bitancourt y Jenkins, 1936a,b; Boedijn, 1961; Tan *et al.*, 1996). En muchos casos, el principal impacto de la roña es la afectación de la apariencia del producto cosechado, lo que limita su aceptabilidad en el mercado, más que afectar la productividad del cultivo (Swart *et al.*, 2001).

El orden Myriangiales fue introducido por Starback (1899) y está conformado por las familias Elsinoaceae y Myriangiaceae, que representan un grupo hermano de Dothideales, el orden tipo de los Dothideomycetes (Li *et al.*, 2011; Hyde *et al.*, 2013; Dissanayake *et al.*, 2014; Jayawardena *et al.*, 2014). Elsinoaceae comprende actualmente 10 géneros que incluyen *Beelia*, *Butleria*, *Elsinoe*, *Hemimyriangium*, *Hyalotheles*, *Micularia*, *Mollerella*, *Saccardinula*, *Stephanotheca* y *Xenodium* (Lumbsch y Huhndorf 2007). La familia se caracteriza por un ascoma inmerso, compuesto de una pared delgada y gelatinosa de hifas o células pseudo-parenquimatosas. Las ascas están dispuestas en lóculos individuales, en una sola capa o dispersas irregularmente, globosas, bitunicadas y funiculares. Las ascosporas son hialinas a pardas, septadas o algunas veces muriformes (Kirk *et al.*, 2001, 2008). Los anamorfos conocidos en Elsinoaceae como *Sphaceloma* son coelomicetos acervulares con células conidiogénicas polifialídicas (Sivanesan, 1984).

El género *Elsinoe* fue introducido por Raciborski (1900) con descripciones de las especies *E. antidesmae*, *E. canavaliae* y *E. menispermacearum*. Inicialmente se habían registrado más de 140 epítetos de especies llamadas *Elsinoe* y más de 160 epítetos de especies asexuales de *Sphaceloma* en el *Indice Fungorum* y MycoBank, con aproximadamente 48 especies de *Elsinoe* y 52 especies de *Sphaceloma* (Kirk *et al.*, 2008). Después de los análisis

filogenéticos y el examen morfológico de 119 aislamientos realizados por Fan *et al.* (2017) ahora se reconocen 75 especies, de las cuales ocho están recién descritas, 13 están epitepificadas y 26 nombres de especies se sugieren como nuevas combinaciones basadas en la iniciativa de nomenclatura única (Wingfield *et al.*, 2012; Crous *et al.*, 2015a).

Las especies del género *Elsinoe* son fitopatógenos causantes de enfermedades como la costra, mancha en hoja y fruto y antracnosis. Presenta ascostromas solitarios o gregarios, similares a verrugas, o como pequeñas elevaciones de colores distintivos, sumergidos a semi-sumergidos, globosos a subglobosos, blancos, amarillo pálido o marrón, blandos, multilóculados, lóculos dispersos en la parte superior de ascostroma, las células del ascostroma comprenden células pseudoparenquimatosas de textura globulosa a angular. Lóculos con ascas. Ostiolo periférico ausente, ascas con 8 esporas, bitunicadas, globosas, con un pedicelo diminuto y cámara ocular. Ascosporas dispuestas irregularmente, oblongas o fusiformes con extremos ligeramente redondeados, con 2–3 septos transversales, hialino, de paredes lisas, sin una vaina. *Sphaceloma* es la forma asexual; forma acérvulos o esporodoquios subepidérmicos pseudoparenquimatosos. Conidióforos hialinos a marrón pálido, polifialídicos. Células conidiogénicas formadas directamente de las células superiores del pseudoparenquima, mono o polifialides hialinas a pardas pálidas, sin engrosamiento periclinal visible. Conidios hialinos, lisos, aseptados, elipsoidales y gutulados (Hyde *et al.*, 2013).

Las características morfológicas de las especies de *Elsinoe* son difíciles de observar, ya que la morfología sexual es poco común en la naturaleza. La forma asexual de Elsinoaceae corresponde a un hongo coelomycete acérvular con células conidiógenas polifialídicas, como el morfotipo asexual *Sphaceloma* de *Elsinoe* (Jenkins, 1932b; Kirk *et al.*, 2008).

Una de las especies de importancia económica de *Sphaceloma* es *ampelina*, este hongo es comúnmente conocido como el agente causal de la antracnosis de la vid (Figura 1a) (Jenkins, 1947), es de origen europeo y causa grandes pérdidas en varios países vitivinícolas de todo el mundo, requiere control químico, especialmente cuando las uvas se cultivan en condiciones húmedas (de Bary, 1874; Shear, 1929; Amorim y Kuniyuki, 2005; Poolsawat *et al.*, 2010; Carisse y Morissette, 2013).

Elsinoe fawcettii se conoce comúnmente como el agente causal de la enfermedad de la costra de los cítricos, causando grandes pérdidas en todo el mundo, especialmente para el

mercado de frutas frescas. Los síntomas incluyen lesiones ásperas en hojas y frutos, con forma de corcho, parecidas a verrugas, translúcidas, verdes o bronceadas al principio, que se vuelven marrones en el centro, pero que se tornan purpuras en los frutos (Figura 1b-c). Jenkins (1925) describió la forma asexual, *Sphaceloma fawcettii*, tiene conidios hialinos, oblongos a elipsoidales, $5-10 \times 2-5 \mu\text{m}$. Bitancourt y Jenkins (1936a) describieron la forma sexual de este hongo, que se caracteriza por ascostromas dispersos que contienen ascas globosas a ovoide, $12-16 \mu\text{m}$ de diámetro y hialinas, oblongas a elipsoidales, ascosporas septadas, $10-12 \times 5-6 \mu\text{m}$.

Elsinoe phaseoli Jenkins es conocida por causar la roña del frijol (*Phaseolus lunatus*) en Cuba (Figura 1d) (Bruner y Jenkins, 1933). Posteriormente se informó sobre *Phaseolus* y *Vigna* en África, América y Brasil (Lasca, 1978; Phillips, 1994). Los síntomas incluyen lesiones circulares en las hojas, que se presentan en la superficie superior de la hoja, $2-3 \text{ mm}$ de diámetro; lesiones en los tallos alargadas, de color blanco a gris, ligeramente hundidas en vainas verdes, tornándose de color marrón rojizo, ligeramente elevadas, $2-3 \text{ mm}$ de diámetro. Este hongo se caracteriza por ascosmas ovoides a subglobosos, $14-22 \times 21-27 \mu\text{m}$, y ascosporas hialinas, oblongas a elipsoidales, $10-15 \times 4-5 \mu\text{m}$, con 2-3 septos (Bruner y Jenkins, 1933; Phillips, 1994). Los conidios son oblongos a elipsoides, $6 \times 2 \mu\text{m}$ (Phillips, 1994).

Elsinoe punicae (Bitanc. & Jenkins) se describió originalmente a partir de manchas foliares de *Punica granatum* en Argentina, y luego se registró en Brasil e Italia (Figura 1e) (Bitancourt y Jenkins, 1940a). Las manchas violetas a morado negruzco se extienden a la nervadura central y las venas, y se vuelven más pálidas en el centro al secarse. Además, se identificó *Sphaceloma punicae* a partir de lesiones similares a sarna de frutas en China (Xiao-Hui *et al.*, 2004) y manchas oxidadas en frutas y hojas en India (Jamadar *et al.*, 2011).

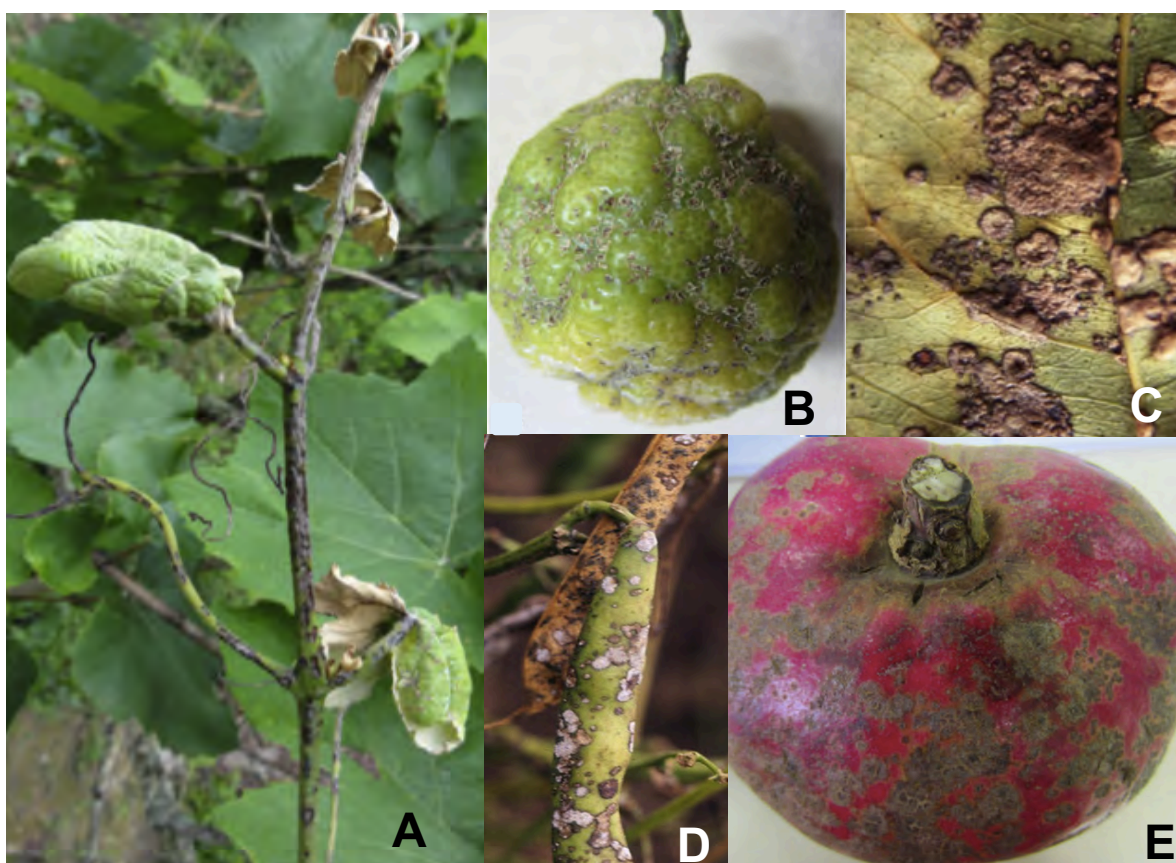


Figura 1. Síntomas característicos de especies de *Sphaceloma*. (A). *S. ampelina* (foto Fan *et al.*, 2017), (B, C). *S. fawcettii* en fruto y hoja respectivamente (foto: Paul Fourie, South Africa), (D). *S. phaseoli* (foto: Deidre Fourie, S. Africa), (E). *S. punicae*. (foto: M. Mirabolfathy, Iran).

Elsinoe piri causa antracnosis en manzana y pera, es económicamente importante en cultivos orgánicos, pero rara vez se observa en huertos con un régimen de fungicidas convencionales (Scheper *et al.*, 2013). Tiene una distribución mundial y a menudo se ha registrado incorrectamente como "*Elsinoe pyri*" (Jenkins, 1932a). Los síntomas incluyen manchas de hojas de color gris blanquecino con márgenes marrones, con ascostromas visibles de color marrón oscuro en el centro de las manchas. Las manchas en las frutas pueden variar en color, desde el blanco hasta el marrón amarillo pálido, hasta marrón en el centro y rodeado por un margen rojo oscuro. Este hongo se caracteriza por conidios hialinos, aseptados, $4-6 \times 2.5-4$

μm , que pueden estar presentes en acérvulos en hojas y frutos (Woronichin, 1914; Jenkins 1932a; Jenkins *et al.*, 1946; Scheper *et al.*, 2013).

Elsinoe rosarum Jenkins y Bitanc, Passerini (1881) describió este hongo como *Phyllosticta rosarum* causando antracnosis de la rosa en Italia. Sin embargo, se confundió con patógenos similares como *Elsinoe veneta* causando antracnosis en zarza y *E. piri* asociada con antracnosis de manzana y pera (Jenkins, 1932a). Más tarde, Jenkins (1932b) separó las especies como distintas según el tipo de antracnosis que causaron y trató a *Phyllosticta rosarum* como *Sphaceloma rosarum* basándose en su morfología típica de *Sphaceloma* de la forma asexual. Los síntomas incluyen manchas oscuras, púrpuras y negras de la hoja con márgenes de color marrón lívido opaco, que aparecen en cualquier parte de las hojas, incluyendo nervadura central y venas; las lesiones en los tallos generalmente son circulares o alargadas, de color café lívido opaco, se vuelven blancas o cenicientas, se levantan y, a veces, se deprimen en el centro. *Elsinoe rosarum* se describió originalmente en *Rosa* sp. recolectadas en los EE. UU. (Jenkins y Bitancourt, 1957).

Otra especie de las especies de mayor importancia económica es *Sphaceloma perseae* (Holliday, 1980). Las lesiones producidas por esta especie son de color marrón a casi negro y hasta de 3 mm de diámetro. Los acérvulos se desarrollan en esporodoquios dispersos, oscuros o verde pálido y de 25 a 70 μm de longitud. Los conidióforos, uni o bicelulares en una primera etapa, miden alrededor de 12 μm de longitud por 2 a 7 μm de grosor en la base; ahusados o agudos a truncados en el ápice, proceden de hifas hialinas, intra-epidérmicas o de un estroma prosenquimatoso. Cuando rompen la epidermis, aumentan en longitud ya sea por crecimiento continuo o por permanencia de conidios *in situ* que se desarrollan como parte del conidióforo, alcanzando una longitud de 25 a 50 o hasta 100 μm ; en esta etapa son más o menos divergentes, continuos a pluri-septados, rectos o geniculados, generalmente simples, a veces denticulados, y con frecuencia se vuelven más pálidas hacia el ápice.

Los conidios son hialinos o coloreados, claros o granulares, acrogenados o pleurogenosos pueden ser esféricos a cilíndricos, midiendo de 2 a 30 por 2 a 5 μm ; los conidios hialinos son ovoides u oblongo-elípticos, a menudo de 5 a 8 por 3 a 4 μm , a veces bigutelados, mientras que los conidios son elongados de 1 a 6 células, hasta 30 por 3 a 5 μm (a menudo uni a bicelulares y de 12 a 20 μm de largo). A veces los conidios están muy dilatados o hinchados

y muriformes. La germinación se lleva a cabo por conidios hialinos de germinación o por tubos germinales, producidos a menudo apical o sub-apicalmente, pero también lateralmente (Jenkins, 1934b). Las ascosporas son hialinas a café, septadas transversalmente o mutiformes, las cuales son liberadas solo por rompimiento de las capas estromatales superiores (Kirk *et al.*, 2008; Hyde *et al.*, 2013).

Sphaceloma perseae causa síntomas "corchosos" en la fruta y hojas del aguacate (Figura 2). En las hojas, las lesiones suelen ser de color rojo, y el centro puede desprenderse para dar lugar a perforaciones. Las lesiones en las hojas se forman con más frecuencia en la parte superior de la copa de los árboles y la superficie adaxial muestra una mayor susceptibilidad en comparación con la superficie abaxial (Pernezny y Marlatt, 2007). En la superficie abaxial de las hojas las masas de conidios son de color marrón claro oliva. La capa aterciopelada se pierde gradualmente por la intemperie hasta que sólo quedan unos pocos conidióforos cuando la fruta tiene 4 meses de edad (Jenkins, 1934a). Después de un mes, las hojas pueden volverse resistentes a la infección y la fruta se vuelve resistente después de que alcanza la mitad de su tamaño final (Pernezny y Marlatt, 2007).



Figura 2. Síntomas de *Sphaceloma perseae* en fruto de aguacate (foto: Fan *et al.*, 2017).

Aunque en campo los síntomas de la roña se reconocen fácilmente, el diagnóstico de las muestras recolectadas a menudo es erróneo por la falta de estructuras fértiles o debido a que el síntoma se confunde con el de daños mecánicos o inducidos por insectos (Téliz y Mora, 2007).

Además, el aislamiento de *Elsinoe* en cultivo puro es muy complicado debido a su lento crecimiento, lo que impide su desarrollo por los contaminantes (Fan *et al.*, 2017). Existen estudios en los que se evalúan diferentes medios de cultivos para acelerar el crecimiento de algunas especies de *Sphaceloma*, sin embargo, esto aumenta la variabilidad en las características morfológicas de las colonias (Poolsawat *et al.*, 2009). Cheema *et al.* (1978) informaron variaciones en el diámetro de la colonia de 9 aislados de *S. ampelinum* cultivados en diferentes medios de cultivo. Álvarez y Molina (2000) informaron que el crecimiento de la colonia de *S. manihoticola*, el patógeno causal de la súper elongación de la yuca, fue irregular y altamente variable entre los diferentes aislamientos. Otras características morfológicas que se ven afectadas por el tipo de medio donde se desarrollan son: color y textura de la colonia, producción de micelio aéreo, esporulación y los pigmentos producidos por muchas especies de *Elsinoe* (Weiss *et al.*, 1957), esto es debido a que la cantidad de nutrientes en los medios de cultivo no son las mismas (Oythip *et al.*, 2009).

Las colonias de *Sphaceloma persea* en PDA son de crecimiento lento, con apariencia abultada que con el tiempo toman forma de cerebroide. Los cultivos son oscuros en la parte inferior de las placas, y el micelio es de color rosa a beige claro (Everett *et al.*, 2010). Las características morfológicas en PDA de *Elsinoe anacardii* son bastante distintas de la apariencia habitual de las colonias *Elsinoe*, con micelio aéreo blanco algodonoso en la superficie y micelio verde en el reverso de la placa (Wani y Thirumalachar, 1969, 1970).

Por otra parte, *Elsinoe asclepiadea* presenta lento crecimiento (9-12 mm diámetro, después de 23 días), en EMA (Figura 3a), las colonias son cerebriformes y generan ruptura del medio, algunas con micelio aéreo piloso en diferentes partes de la colonia, grupos gelatinosos y mucilaginosos, gotas abundantes a nivel central, al reverso las colonias tienen muchas grietas en medio visible (Fan *et al.*, 2017). Las colonias de *Elsinoe australis* en EMA son irregulares, erupientes, plegadas, de color gris oscuro a negro, con márgenes lisas y micelio aéreo blanco o gris disperso; 25–35 mm de diámetro después de 3 semanas (Figura 3b).

Elsinoe veneta conocido por causar la antracnosis en frambuesa, presenta colonias circulares, errumpentes, plegadas, rosadas de superficie afelpada color albaricoque con blanco, márgenes lisos y micelios aéreo; 15-18 mm diámetro después de 3 semanas (Figura 3c) (Fan *et al.*, 2017).

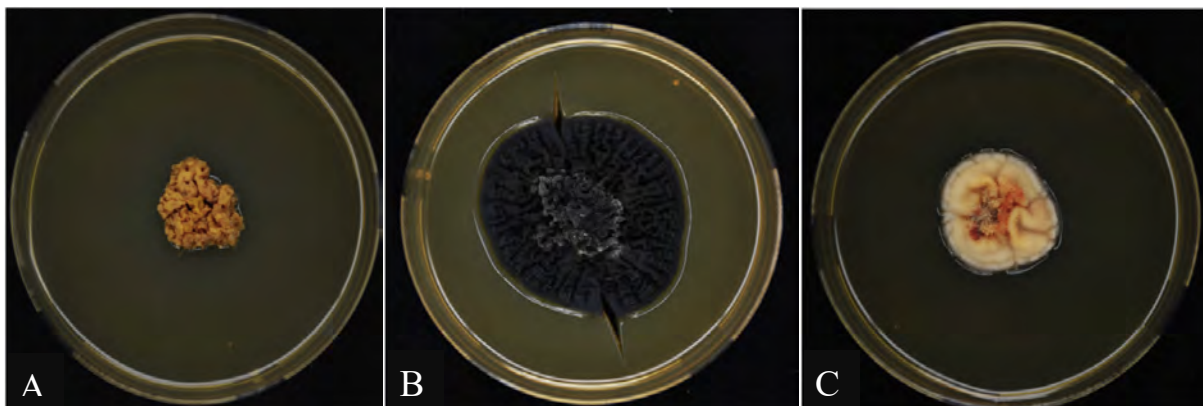


Figura 3. Colonias de *Elsinoe* spp. en EMA después de 3 semanas. (A) *Elsinoe asclepiadea*, (B) *Elsinoe australis*, (C) *Elsinoe veneta*, (fotos: Fan *et al.*, 2017).

El crecimiento de la colonia de *S. manihoticola*, el patógeno causal de la súper elongación de la yuca, es irregular y altamente variable entre diferentes aislamientos (Álvarez y Molina, 2000). Existe gran variación de la morfología de las colonias de *Sphaceloma* dependiendo la ubicación geográfica de donde se obtengan los aislados y el tipo de medio de cultivo donde se reproduzcan, tanto el color como la producción de micelio aéreo dependen de la cantidad de nutrientes que el hongo obtenga (Othip *et al.*, 2009). La formación de micelio aéreo parece estar asociada con la esporulación en este patógeno. Es posible que los medios con alto contenido de nutrientes no sean adecuados para inducir la esporulación en algunos hongos. En su lugar, pueden promover un alto crecimiento del micelio de la superficie, pero una baja formación de micelio aéreo (Anonymus, 2007).

Engelkes *et al.* (1997) informaron que la cantidad de fuente de carbono en el medio de cultivo es importante para el crecimiento de los hongos. Sin embargo, la proporción C:N parece ser más influyente para la esporulación que la concentración de carbono (Goa *et al.*, 2007). La disminución del nitrógeno en el medio de cultivo es de suma importancia para inducir la aparición de un metabolito secundario que da lugar a la formación del pigmento rojo (Bu'lock

et al., 1974). Bitancourt y Jenkins (1941) propusieron el nombre de elsinochrome A para este compuesto.

Los elsinocromos son pigmentos rojos o naranjas producidos por diversas especies de fitopatógenos del género *Elsinoe* (Weiss *et al.*, 1987). Entre las principales especies de *Sphaceloma* que producen este compuesto se encuentran: *S. manihoticola* (Rademacher *et al.*, 1982; Rave, 1980), *Sphaceloma tectiferae* (Cheewangkoon *et al.*, 2009), *Sphaceloma randii* (Weiss *et al.*, 1957), *S. annonae* y *Sphaceloma fawcettii* (Hui y Kuang, 2008).

Los pigmentos de Elsinochrome que contienen un cromóforo de quinona fenólica consisten en al menos cuatro derivados. Las estructuras y propiedades químicas de los elsinocromos A, B y C están bien establecidas (Weiss *et al.*, 1957, 1965; Chen *et al.*, 1966; Lousberg *et al.*, 1969a, b, 1970; Mebius *et al.*, 1990). Elsinocromo D, probablemente derivado del elsinocromo C, se identificó y caracterizó a partir de la mezcla de pigmentos de *Elsinoe annonae* (Lousberg *et al.*, 1970; Kurobane *et al.*, 1981; Shirasugi y Misaki, 1992).

Los elsinocromos están relacionados estructuralmente con varias perileno-quinonas, como la altertoxina I producida por *Alternaria alternata*, Cercosporina producida por muchos *Cercospora* spp. Hipericina producida por *Hypericum* spp. Hipocrelina A producida por *Hypocrella bambusae*, y el fleichrome producido por *Cladosporium* spp. (Yoshihara *et al.*, 1975; Assante *et al.*, 1977; Daub, 1982a; Duran y Song, 1986; Stierle y Cardellina, 1989; Daub *et al.*, 2005). Todos los compuestos tienen un cromóforo de 4,9-dihidroxiperileno-3,10-quinona común y solo difieren en las cadenas laterales unidas (Daub *et al.*, 2005).

Estos compuestos se agrupan como fotosensibilizadores en función de su capacidad para sensibilizar las células a la luz visible y producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yamazaki *et al.*, 1975; Daub, 1982a). Según Hui y Kuang (2008) los elsinocromos inducen toxicidad celular en las células vegetales al funcionar como compuestos fotodinámicos que generan especies reactivas de oxígeno y desempeñan un papel importante en la virulencia fúngica.

Aunque muchas especies de *Elsinoe* se describieron en un estudio taxonómico reciente (Fan *et al.*, 2017), no se proporciona una descripción morfológica general del género probablemente debido a la falta de nuevos aislamientos. *Elsinoe* ha sido objeto de investigación limitada en todo el mundo (Santos *et al.*, 2017). Las características morfológicas de las especies

de este género son difíciles de observar, ya que la forma sexual es poco común en la naturaleza. En patógenos que se reproducen solo asexualmente, se produce recombinación, se pueden transferir genotipos completos de una población a otra, un proceso conocido como flujo de genotipos (Agrios, 2005).

Las herramientas moleculares se han vuelto cada vez más importantes para resolver las conexiones entre las diferentes etapas del ciclo de vida y la interpretación de la variación morfológica (Cheewangkoon *et al.*, 2009). Recientemente, Fan *et al.* (2017) combinaron secuencias taxonómicas del interespaciador transcrito (ITS), subunidad grande (LSU), RBP2 y TEF1- α de 119 aislados para obtener una filogenia de diferentes genes para el género *Elsinoe*. Sin embargo, las secuencias de LSU generalmente no son suficientemente polimórficas para analizar la diversidad genética intraespecífica, dando como resultado que la región ITS es la adecuada para distinguir la mayoría de las especies del género *Elsinoe*, resolviendo 61 de 74 (82.4 %) de las especies incluidas en el árbol filogenético.

Bagsic *et al.* (2016) realizaron un análisis de AFLP en los 14 aislados de *Sphaceloma* verificados por secuenciación. Utilizando cuatro combinaciones de iniciadores AFLP, se amplificaron 178 fragmentos claramente puntuables. De estos fragmentos, 145 eran polimórficos (81 ± 4 %), con un promedio de 36 fragmentos polimórficos por combinación del iniciador. Diversos estudios han indicado que los marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) son útiles para la identificación y diferenciación de razas o patotipos de muchos hongos. Hyun *et al.* (2001) los utilizaron para determinar el nivel de variabilidad genética entre los aislamientos, patotipos y especies mediante el análisis de RAPD de *Elsinoe fawcetti* y *Elsinoe australis*. Hou *et al.* (2014) investigaron la especificidad del hospedero y las relaciones genéticas entre 46 aislados de *E. fawcettii* mediante pruebas de patogenicidad y ensayos ISSR para separar los diferentes patotipos. Otros estudios detectaron marcadores moleculares SSR relacionados con la resistencia de la batata dulce de pulpa naranja a la sarna causada por *Sphaceloma batatas*. Este hallazgo indicó que marcadores SSR particulares se pueden utilizar para desarrollar una variedad resistente al agente causal de la enfermedad de la costra (Nurfitriani, 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio y colecta de muestras

El estudio se realizó en la franja aguacatera de Michoacán, en huertos comerciales de aguacate Hass ubicados en 5 regiones agroclimáticas (Gutiérrez *et al.*, 2010) que comprendieron los municipios de Ario de Rosales, Tancitaro, Tingambato, Uruapan y Ziracuaretiro (cuadro 1, Figura 4). En cada municipio se seleccionaron huertos con presencia de la enfermedad y se utilizó un muestreo dirigido a árboles y frutos con síntomas evidentes de roña. Para cada muestra se seleccionaron de la parte media del árbol, frutos de entre 2 y 10 cm de longitud, con lesiones iniciales tanto en la epidermis como en el pedúnculo. Los muestreos se llevaron a cabo durante los meses de octubre 2017 a marzo de 2018. En total se colectaron 150 frutos. Los frutos se colocaron en bolsas plásticas ziploc® y se trasladaron al laboratorio de Fitopatología II de la Facultad de Agrobiología.

Cuadro 1. Características climáticas de cinco zonas agroecológicas de Michoacán en donde se cultiva aguacate.

Zona agroecológica	Clima	Temperatura (°C)	Precipitación (mm)	Humedad relativa	Superficie (ha)
I	(A)C(m)(w)*	16-20	1200-1500	70-90 %	23,107,91
III	(A)C(w ₂)(w)*	18-22	1000-1500	70-90 %	15,674,83
VII	(A)C(w ₁)(w)*	18-22	1000-1200	70-90 %	3,720,7
VIII	A w ₀ (w)*	22-26	800-1000	45-70 %	2,550,66
IX	C(w ₂)(w)*	18-22	1000	70 %	1,421,75

*(A)C = Semicálido, (m)(w)= Húmedo con lluvias intensas de verano que compensan la sequía de invierno; precipitación del mes más seco inferior a los 60 mm; % de lluvia invernal menor a 5, (w₂)(w)= Los más húmedos de los subhúmedos con un cociente P/T(precipitación total anual en mm, sobre temperatura media anual °C) mayor de 55.3. (w₁)(w)= Los intermedios en cuanto a grado de humedad con un cociente P/T entre 43.2 y 55.3, A= Cálido, (w₀)(w)= Los más secos de los subhúmedos, con un cociente P/T menor de 43.2, C= Templado, (w₂)(w)= Los más húmedos de los subhúmedos con un cociente P/T (precipitación total en mm, sobre temperatura media anual °C) mayor de 55.0. (Gutiérrez *et al.*, 2010, INEGI)

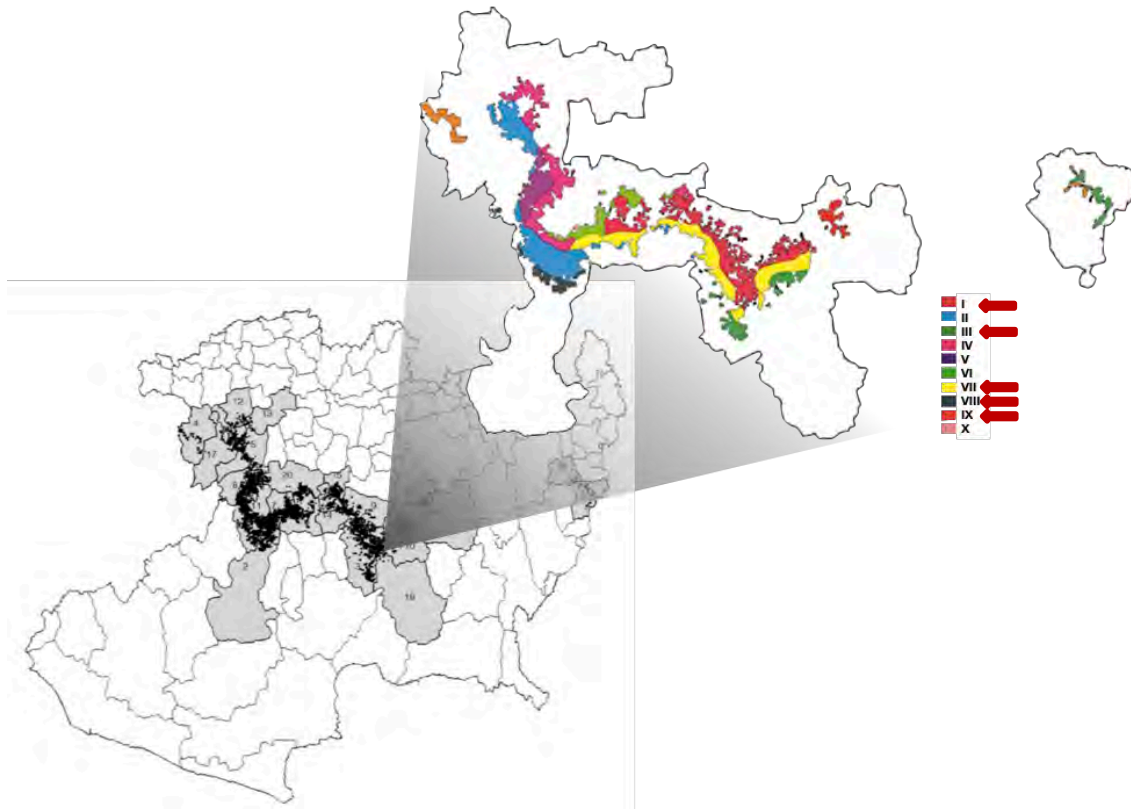


Figura 4. Zonas agroecológicas determinadas para 22 municipios de la franja aguacatera de Michoacán, México (Gutiérrez *et al.*, 2010).

3.2 Aislamiento

Los frutos se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar dentro de la campana de flujo laminar. De cada fruto, se tomaron lesiones frescas de roña de diferentes diámetros, tanto de la epidermis del fruto como del pedúnculo. El tejido se desinfectó por 90 s en una solución de hipoclorito de sodio al 6 % seguido por un lavado de 30 s con agua destilada estéril, después se sumergió en una solución de alcohol al 70 % durante 60 s y se finalizó con un segundo lavado de 30 s con agua destilada estéril; el tejido se secó en papel filtro esterilizado y se sembró en placas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, Difco) adicionado con 100 mg de sulfato de estreptomicina (Sigma). Las placas se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad y se revisaron a intervalos de 24 h hasta observar crecimiento de micelio. Una vez que el crecimiento de micelio fue evidente, se realizaron transferencias de punta de hifa a placas Petri conteniendo PDA para obtener cultivos puros. Estas placas se mantuvieron en incubación a 25 °C en condiciones de oscuridad durante cuatro semanas.

3.3 Extracción de ADN

A partir de los cultivos puros de punta de hifa, se realizó la extracción de ADN total de acuerdo con el protocolo de DNAzol®ES (MRC). Con una espátula se tomaron por raspado aproximadamente 40 mg de micelio y se colocaron en un mortero esterilizado. El micelio se maceró en nitrógeno líquido con la ayuda de un pistilo, hasta obtener un polvo fino. El macerado obtenido fue transferido a un tubo Eppendorf de 1.5 mL al que se añadieron 300 µL de Plant DNAzol Reagent® (Invitrogen). La mezcla se homogenizó por inversión y se incubó a 25 °C por cinco minutos. A continuación, se adicionaron 300 µL de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se incubó nuevamente a 25 °C por cinco minutos. La extracción se continuó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN se determinó con un Nano Drop® (Thermo Fisher Scientific) y por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con RedGel (Biotium Inc.) en buffer TAE 1X y visualizados bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador (DNR Bio-Imaging-Systems MiniBis Pro®).

3.4 Amplificación del interspaciador transcrito de rDNA (ITS)

Las regiones ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S, del ADN ribosomal de cuatro aislados seleccionados, se amplificaron por PCR utilizando los iniciadores ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990). Las reacciones de PCR se calcularon para un volumen final de 25 µL conteniendo 1 µL (20 ng) de ADN templado, 0.50 µL (1 µM) de cada uno de los iniciadores, 0.50 µL de dNTP (200 µM), 0.05 µL de Taq ADN polimerasa (5U/µL), 2.50 µL del buffer 10X (-MgCl₂), 1.250 µL de MgCl₂ (50 mM) y 17.65 µL de agua mili Q. Las condiciones en el termociclador (MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler) fueron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineación a 52 °C durante 30 s y extensión a 72 °C por 80 s; se terminó con una extensión final a 72 °C durante 10 min (Crous *et al.*, 2009). Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con RedGel (Biotium Inc.) en buffer TAE 1X y visualizados bajo luz ultravioleta para verificar la pureza y el tamaño del fragmento amplificado. Los productos de la PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc. Las secuencias directa y reversa obtenidas de cada aislado, fueron editadas con el programa ChromasPro (Technelysium Ltd.) y comparadas con secuencias depositadas en el GenBank utilizando el programa Mega BLAST. Las

secuencias con mayor homología fueron descargadas en formato FASTA y alineadas utilizando el programa MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2013).

3.5 PCR con iniciadores específicos para *S. perseae*

Para confirmar la identidad de *S. perseae*, el ADN de 124 aislados se sometió a PCR con los iniciadores específicos para *Sphaceloma perseae* SpF5 (GACCGAACCAACTCTTGAC) y SpR6 (CCACACGCCCAATACCAA), que amplifican una región parcial del ITS de aproximadamente 250 pares de bases (Everett, 2010). Se incluyó como testigo positivo el ADN de uno de los aislados confirmado por secuenciación del ITS como *S. perseae*. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 12.5 μ L compuesta por 1 μ L (20 ng) de ADN, 0.25 μ L del iniciador SpF5 (52.40 nmol), 0.25 μ L del iniciador SpR6 (45.63 nmol), 0.25 μ L de dNTP mix (10 nM), 0.05 μ L de Taq ADN polimerasa (5U/ μ L), 1.250 μ L del buffer 10X (-MgCl₂), 0.625 μ L de MgCl₂ (50 mM) y 8.825 μ L de agua mili Q. Las condiciones del termociclador (MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler) incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 30 s y elongación a 72 °C por 45 s y una extensión final a 72 °C durante 10 min (Everett, 2010). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñido con RedGel (Biotium Inc.) en buffer TAE 1X y se visualizaron en un fotodocumentador (DNR Bio-Imaging-Systems MiniBis Pro®).

3.6 Caracterización morfo-fisiológica de los aislados obtenidos

Para llevar a cabo la caracterización morfológica de *Sphaceloma perseae*, los ciento doce aislados obtenidos de la identificación molecular se agruparon por similitud de colonia en 26 morfotipos. Un aislado de cada morfotipo fue sub cultivado en PDA y se incubaron por 30 días a 25 °C. A partir de las colonias puras de los morfotipos, se cortaron segmentos de 3 mm de diámetro de los bordes en crecimiento activo y se transfirieron a cajas Petri (SYMLaboratorios S.A DE C.V.® de 90 x 15 mm) conteniendo 20 mL de medio de cultivo; los morfotipos se inocularon en dos medios de cultivo, papa-dextrosa-agar (PDA, Difco) y extracto de malta-agar (EMA, Difco) y se incubaron a 21 y 25 °C con un ciclo de 12 h de luz y 12 h oscuridad durante 8 semanas. Cada morfotipo se inoculó por triplicado para cada condición de medio de cultivo y

temperatura de incubación. Se evaluó la tasa de crecimiento, el color y textura de colonia y la producción de pigmentos en el medio de cultivo. El crecimiento de la colonia se midió semanalmente con un calibrador digital de 0.01 mm de resolución (Surtek), sobre dos líneas perpendiculares trazadas en el fondo de la placa; con el crecimiento final de colonia se determinó la tasa promedio de crecimiento (TPC/día) para cada morfotipo, de acuerdo con Jahan *et al.*, (2013).

$$TPC(mm/dia) = \frac{Cf - C0}{T}$$

donde, Cf es el crecimiento de la colonia después de 8 semanas de inoculación y $C0$ es el tamaño inicial de la colonia al momento de la inoculación. T es el número de días transcurridos entre la primer y última medición.

El color las colonias se determinó utilizando las tablas de color de Rayner (1970). La textura de las colonias se determinó tomando como referencia las texturas descritas para otras especies de *Sphaceloma* (Santos *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Tormo 2014; Fan *et al.*, 2017).

3.7 Análisis estadístico

Se determinaron los valores de media y desviación estándar para el crecimiento de colonia y para la tasa de crecimiento de colonia de los 26 morfotipos. Los datos de crecimiento y de tasa de crecimiento fueron representados en gráficos de cajas. Se realizó análisis de varianza para examinar la significancia ($p < 0.05$) de los dos parámetros y la prueba de Tukey (0.05) para comparar las medias de crecimiento y de tasa de crecimiento de los 26 morfotipos. Todos los análisis se realizaron con el lenguaje estadístico R (R Development Core Team, 2014).

IV. RESULTADOS

4.1 Aislamiento

En los 150 frutos colectados, se encontraron lesiones de roña que mostraron variaciones de forma, aspecto y tamaño dependiendo el tiempo de desarrollo que tenía la lesión (Figura 5). De estos frutos se obtuvieron un total de 450 aislados (Cuadro 2), los cuales se caracterizaron por un lento crecimiento que solo fue evidente después de 15 días, tiempo en el que alcanzaron un diámetro de 3 mm. Los aislados obtenidos presentaron un patrón de crecimiento común, desarrollando colonias elevadas en el centro y con bordes irregulares; pero con diferencias notables en la textura y color (Figura 6). En su mayoría las colonias fueron de color rosa (1, 4, 58), algunos aislados mostraron colonias de color amarillo (11), verde (67, 13, 68) y tonalidades de naranja (7, 42). El micelio en contacto directo con el medio de cultivo presentó extensiones miceliales limitadas y con las puntas ramificadas. A medida que la colonia aumentó de diámetro, algunos aislados desarrollaron pigmentos que tiñeron el medio de cultivo y en ocasiones llegaron a causar rupturas del medio. De las lesiones empleadas para realizar los aislamientos, también se obtuvieron de manera eventual aislados de *Colletotrichum* y *Cladosporium*.

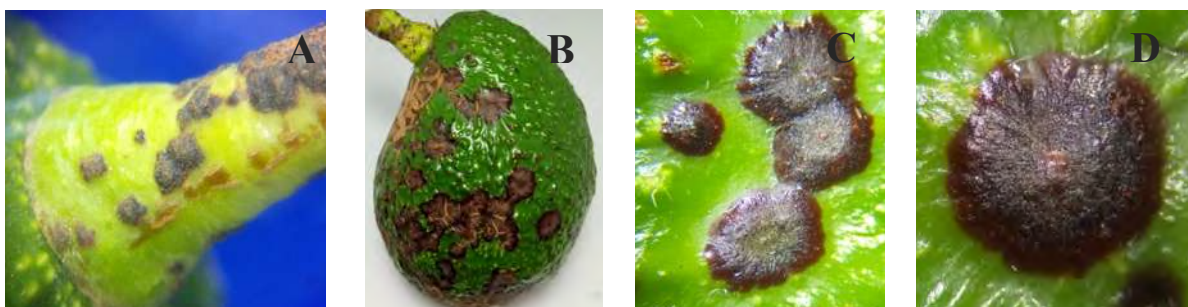


Figura 5. Forma y aspecto de la lesión de roña en. (A) Pedúnculo, (B) Fruto, (C) Parte apical del fruto, (D) Parte frontal del fruto. Nótese el borde de la lesión, la elevación y el color del centro.

Cuadro 2. Números de aislados y tipos de lesiones de donde de aisló *S. perseae* en cada zona agroecológica de Michoacán.

Zona agroecológica	Municipio	Altitud (msnm)	Tipo de lesión	Número de aislado	Morfotipos
I	San Andres C. San Angel Z. Ziracuaretiro Uruapan	1400-1600	Lesión inicial pedúnculo	90	1,10,13,15,17,18, 19,20,21,22,23
III	Uruapan Arrollo Colorado	1400-1800	Lesión inicial lesión avanzada	90	1,2,3,4,5
VII	Ario de Rosales	1801-2000	Lesión inicial	90	3,4,6,7,8,9,10,11, 12
VIII	Táncitaro	1400-1800	Lesión inicial pedúnculo	90	7,9,10,11,15,17,2 4,25,26
IX	Tingambato Ario de Rosales	2001-2200	Lesión avanzada pedúnculo	90	3,13,14,15,16

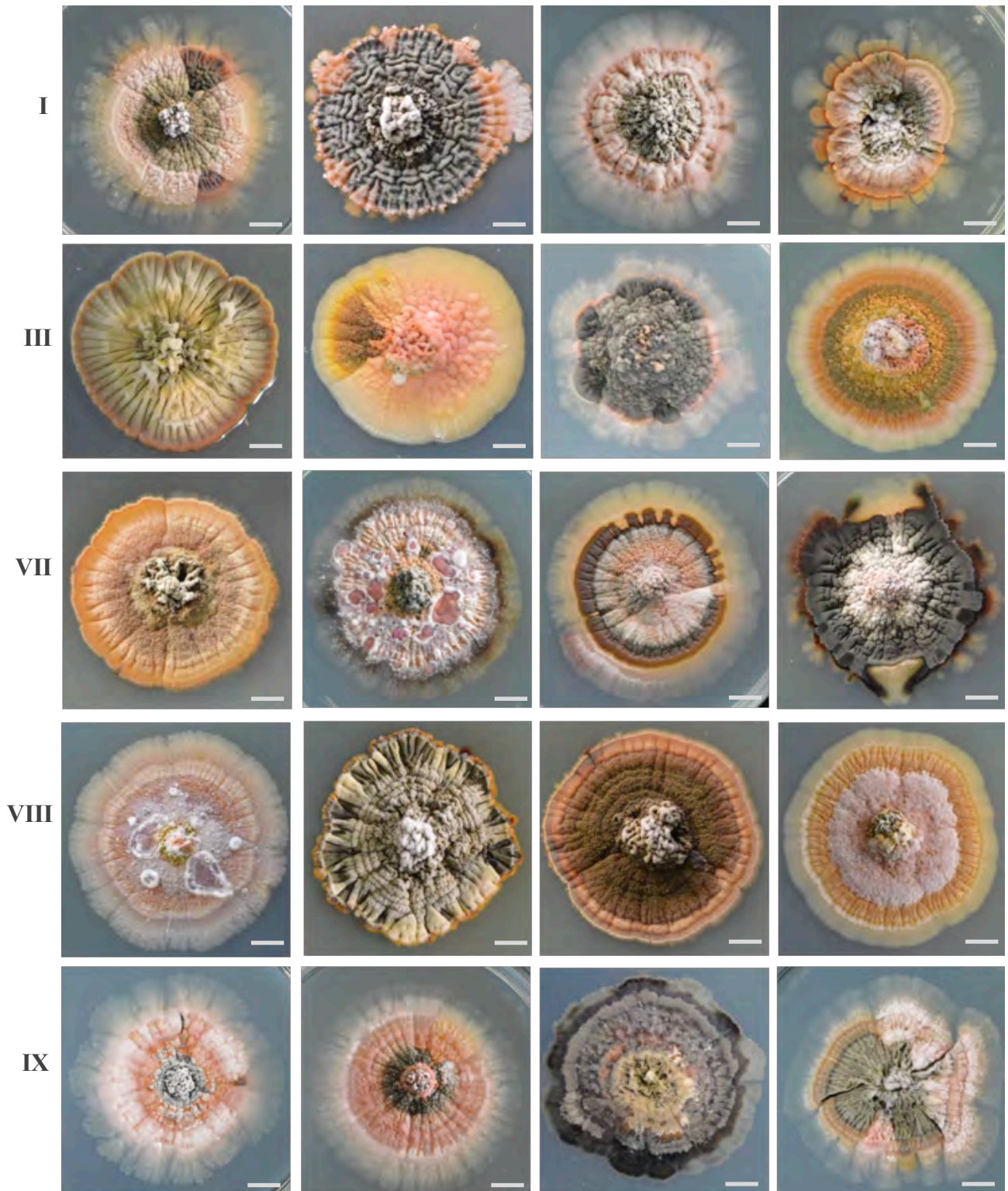


Figura 6. Colonias de *S. perseae* obtenidas de cinco diferentes zonas agroecológicas (I, III, VII, VIII, IX) de Michoacán, después de 21 semanas de incubación en PDA a 25 °C. Barra de escala: 10 mm.

4.2 Identificación molecular

De los 124 aislados tipo sometidos a identificación molecular por PCR con el empleo de los iniciadores específicos SpF5 y SpR6, 112 aislados amplificaron para la banda esperada de 250 pares de bases, lo que permite de acuerdo con Everett (2010), confirmar que éstos 112 aislados tipo corresponden a *Sphaceloma perseae* (Figura 7, Cuadro 3). El testigo positivo correspondiente a ADN de un aislado confirmado por secuenciación como *S. perseae*, también amplificó para dicha banda. En 10 aislados no se obtuvo producto de amplificación. Estos aislados se conservaron para futuros estudios de identificación.

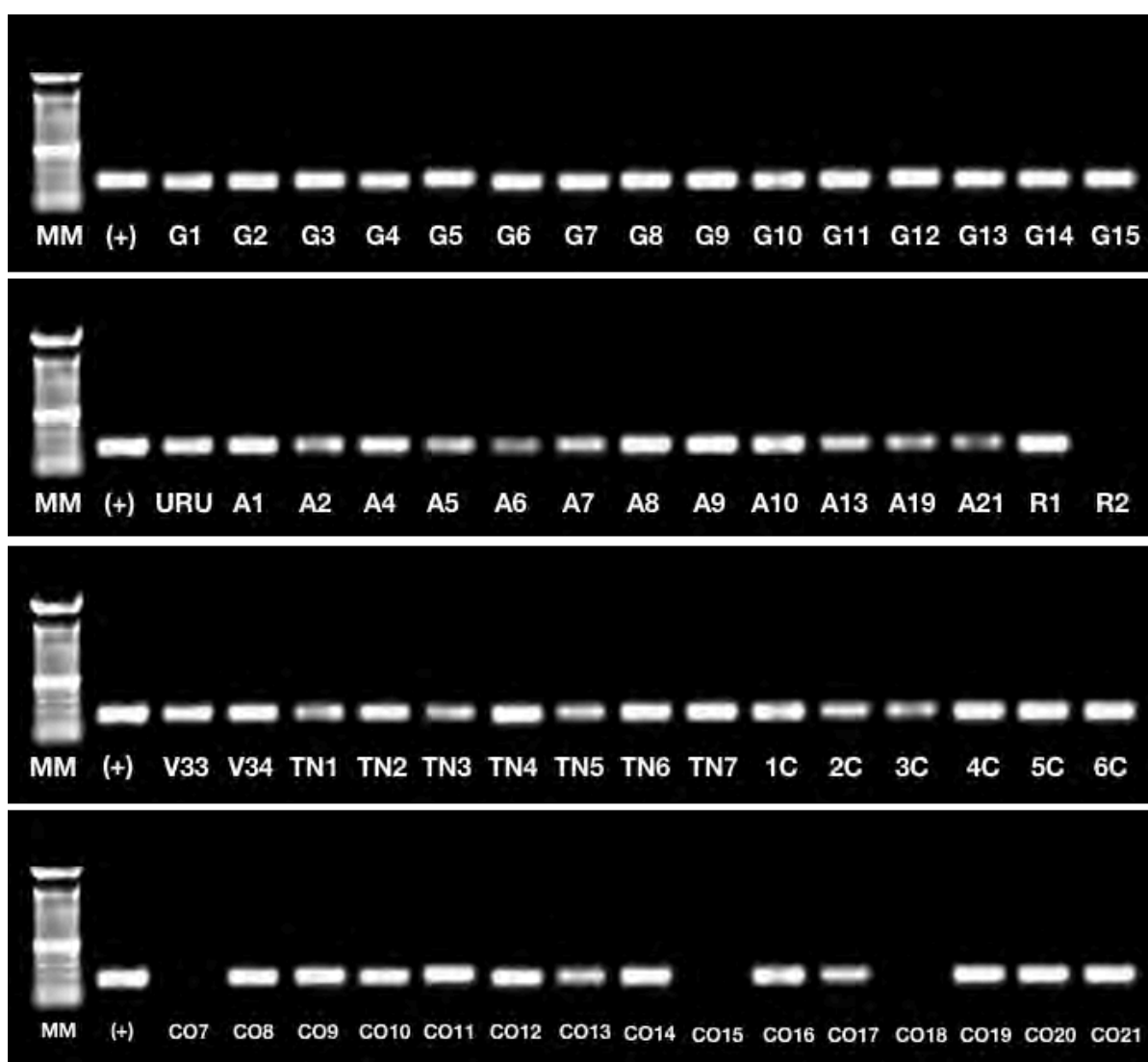


Figura 7. Productos de PCR de muestras de *S. perseae* amplificados con los iniciadores SpF5/SpR6. (MM) Marcador molecular de 100 pb. (+) Testigo positivo.

Cuadro 3. Identificación molecular de aislados obtenidos a partir de síntomas de roña en fruto y pedúnculo en cinco zonas agroclimáticas de la región aguacatera de Michoacán. La identificación se realizó por PCR con los iniciadores SpF5/SpR6.

Aislado	Tejido	Lugar de origen	Zona agroecológica	Especie
G1	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G2	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G3	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G4	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G5	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G6	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G7	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G8	Pedúnculo	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G9	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G10	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G11	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G12	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G13	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G14	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
G15	Fruto	San Andrés Corú	I	<i>S. perseae</i>
URU	Fruto	Uruapan	I	<i>S. perseae</i>
A1	Pedúnculo	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A2	Fruto	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A4	Fruto	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A5	Pedúnculo	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A6	Fruto	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A7	Pedúnculo	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A8	Pedúnculo	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A9	Fruto	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A10	Pedúnculo	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A13	Pedúnculo	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A19	Pedúnculo	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
A21	Fruto	San Ángel Z.	I	<i>S. perseae</i>
R1	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R2	Pedúnculo	Arrollo Colorado	III	*
R3	Fruto	Arrollo Colorado	III	*
R4	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R5	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R6	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R7	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R8	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R9	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R10	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R11	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R12	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R13	Fruto	Arrollo Colorado	III	<i>S. perseae</i>
R14	Fruto	Arrollo Colorado	III	*
CO1	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>

Cuadro 3. Continuación

Aislado	Tejido	Lugar de origen	Zona agroecológica	Especie
CO2	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO3	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO4	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO5	Pedúnculo	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO6	Pedúnculo	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO7	Fruto	Las Yacas	VII	*
CO8	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO9	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO10	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO11	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO12	Fruto	Las Yacas	VII	<i>S. perseae</i>
CO13	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO14	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO15	Fruto	Ario de Rosales	VII	*
CO16	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO17	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO18	Fruto	Ario de Rosales	VII	*
CO19	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO20	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO21	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO22	Pedúnculo	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO23	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO24	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO25	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO26	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO27	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO28	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO29	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO30	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO31	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO32	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO33	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
CO34	Fruto	Ario de Rosales	VII	<i>S. perseae</i>
V1	Fruto	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V2	Fruto	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V3	Fruto	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V4	Fruto	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V5	Pedúnculo	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V6	Pedúnculo	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V7	Fruto	El Palmito	VIII	*
V8	Fruto	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V9	Fruto	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V10	Fruto	El Palmito	VIII	*
V11	Fruto	El Palmito	VIII	<i>S. perseae</i>
V12	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>

Cuadro 3. Continuación

Aislado	Tejido	Lugar de origen	Zona agroecológica	Especie
V13	Pedúnculo	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V14	Pedúnculo	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V16	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V17	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V18	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V19	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V20	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V21	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V22	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V23	Pedúnculo	Juntas de Erandiro	VIII	*
V24	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	*
V25	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	*
V26	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	*
V27	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V28	Pedúnculo	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V29	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V30	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V31	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V32	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V33	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
V34	Fruto	Juntas de Erandiro	VIII	<i>S. perseae</i>
TN1	Fruto	Tingambato	IX	<i>S. perseae</i>
TN2	Fruto	Tingambato	IX	<i>S. perseae</i>
TN3	Fruto	Tingambato	IX	<i>S. perseae</i>
TN4	Fruto	Tingambato	IX	<i>S. perseae</i>
TN5	Fruto	Tingambato	IX	<i>S. perseae</i>
TN6	Fruto	Tingambato	IX	<i>S. perseae</i>
TN7	Fruto	Tingambato	IX	<i>S. perseae</i>
1C	Fruto	Ario de Rosales	IX	<i>S. perseae</i>
2C	Fruto	Ario de Rosales	IX	<i>S. perseae</i>
3C	Fruto	Ario de Rosales	IX	<i>S. perseae</i>
4C	Fruto	Ario de Rosales	IX	<i>S. perseae</i>
5C	Fruto	Ario de Rosales	IX	<i>S. perseae</i>
6C	Fruto	Ario de Rosales	IX	<i>S. perseae</i>
7C	Fruto	Ario de Rosales	IX	<i>S. perseae</i>

* No amplificó

4.3 Caracterización morfo-fisiológica

Los 112 aislados tipo confirmados como *Sphaceloma perseae*, se agruparon por características similares de color y textura obteniendo 26 morfotipos diferentes (Figura 8) que fueron utilizados para la caracterización morfológica.



Figura 8. Morfotipos utilizados en la caracterización morfo-fisiológica de *S. perseae*.

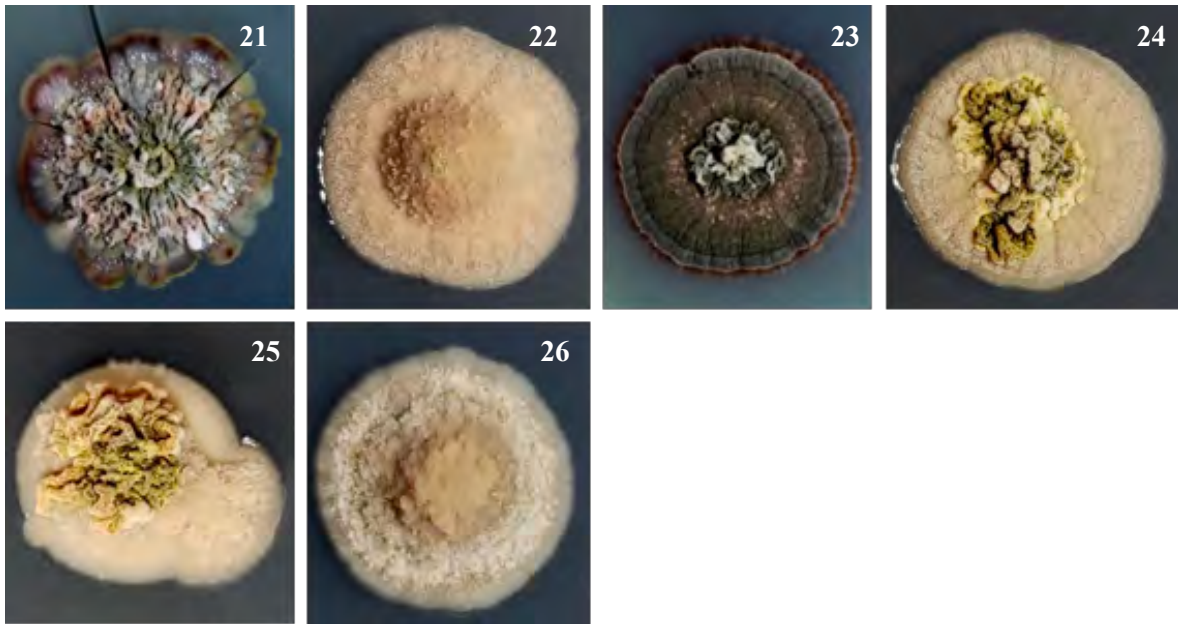


Figura 8. Continuación.

4.3.1 Crecimiento de la colonia de *Sphaceloma perseae*

El crecimiento de todos los morfotipos de *Sphaceloma* en medio de cultivo se caracterizó por ser muy lento, sin embargo, se observó variación en el tamaño de colonia en función del medio de cultivo y la temperatura de incubación (Figura 9). El análisis de varianza de una vía para la variable crecimiento total de los morfotipos en cada una de las combinaciones medio de cultivo-temperatura indicó diferencias estadísticas significativas en EMA 21 °C, EMA 25 °C y PDA 21 °C, pero no en PDA 25 °C. La comparación de medias (Tukey, 0.05) indicó que existen variaciones importantes en el crecimiento de los 26 morfotipos y que los morfotipos 5, 7 y 26 presentaron el mayor crecimiento en los dos medios de cultivo y en las dos diferentes temperaturas (Cuadro 4), en tanto que el morfotipo 16 fue el de menor crecimiento. El resto de los morfotipos se comportaron de manera similar.

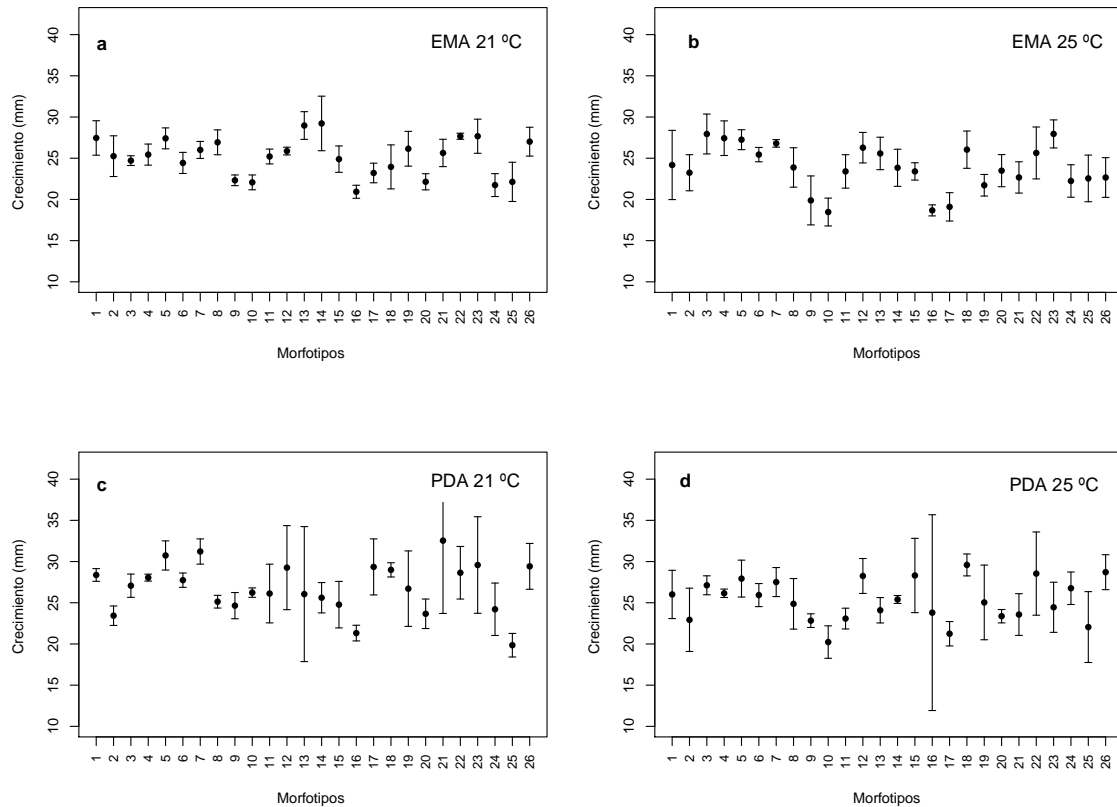


Figura 9. Crecimiento (mm) de 26 morfotipos de *Sphaceloma perseae* en dos medios de cultivo y dos temperaturas. Los puntos representan la media de crecimiento de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar.

Cuadro 4. Efecto de dos medios de cultivo y dos temperaturas en el crecimiento (mm) de 26 morfotipos de *Sphaceloma perseae*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Morfotipo	EMA21°C	EMA25°C	PDA21°C	PDA25°C
1	27.46 abcd	24.18 abcde	28.37 abc	26.01 a
2	25.25 abcdefg	23.24 abcde	23.43 abc	22.93 a
3	24.71 abcdefg	27.94 a	27.07 abc	27.12 a
4	25.44 abcdefg	27.43 a	28.05 abc	26.15 a
5	27.41 abcd	27.25 a	30.74 abc	27.93 a
6	24.43 abcdefg	25.44 abcd	27.74 abc	25.93 a
7	26.01 abcdefg	26.80 a	31.22 ab	27.51 a
8	26.92 abcdef	23.88 abcde	25.13 abc	24.87 a
9	22.32 defg	19.88 bcde	24.65 abc	22.83 a
10	22.07 efg	18.47 e	26.23 abc	20.23 a
11	25.21 abcdefg	23.40 abcde	26.12 abc	23.08 a
12	25.87 abcdefg	26.28 ab	29.26 abc	28.25 a
13	28.97 ab	25.58 abc	26.05 abc	24.09 a
14	29.22 a	23.84 abcde	25.61 abc	25.40 a

Cuadro 4. Continuación

Morfotipo	EMA21°C		EMA25°C		PDA21°C		PDA25°C	
15	24.89	abcdefg	23.40	abcde	24.77	abc	28.31	a
16	20.93	g	18.67	de	21.32	bc	23.80	a
17	23.21	cdefg	19.10	cde	29.35	abc	21.24	a
18	23.95	bcdefg	26.04	ab	28.99	abc	29.50	a
19	26.15	abcdefg	21.72	abcde	26.71	abc	25.04	a
20	22.14	efg	23.49	abcde	23.66	abc	23.37	a
21	25.64	abcdefg	22.67	abcde	32.54	a	23.57	a
22	27.67	abc	25.64	abc	28.64	abc	28.54	a
23	27.67	abc	27.95	a	29.58	abc	24.45	a
24	21.74	fg	22.24	abcde	23.43	abc	26.76	a
25	22.13	efg	22.55	abcde	19.85	c	22.05	a
26	27.01	abcde	26.66	a	29.42	abc	28.71	a

Cuando se sometió a análisis de varianza el crecimiento de los 26 morfotipos en función de los dos medios de cultivo y las dos temperaturas, se encontró que existía diferencia estadística significativa entre medios de cultivo-temperatura de incubación y que en PDA 21 °C se registró el mayor crecimiento de colonia para 12 de los 26 morfotipos incluidos en el ensayo. El extracto de malta es uno de los medios de cultivo más empleados para la obtención de aislados de *Sphaceloma*, sin embargo, en este estudio el medio de cultivo PDA resultó más efectivo en el crecimiento de los morfotipos evaluados, destacando los morfotipos 5, 7 y 21 como los de mayor crecimiento en PDA 21 °C. En EMA 25 °C se obtuvieron los crecimientos más bajos, correspondiendo a los morfotipos 9, 10, 16 y 17 (Figura 10).

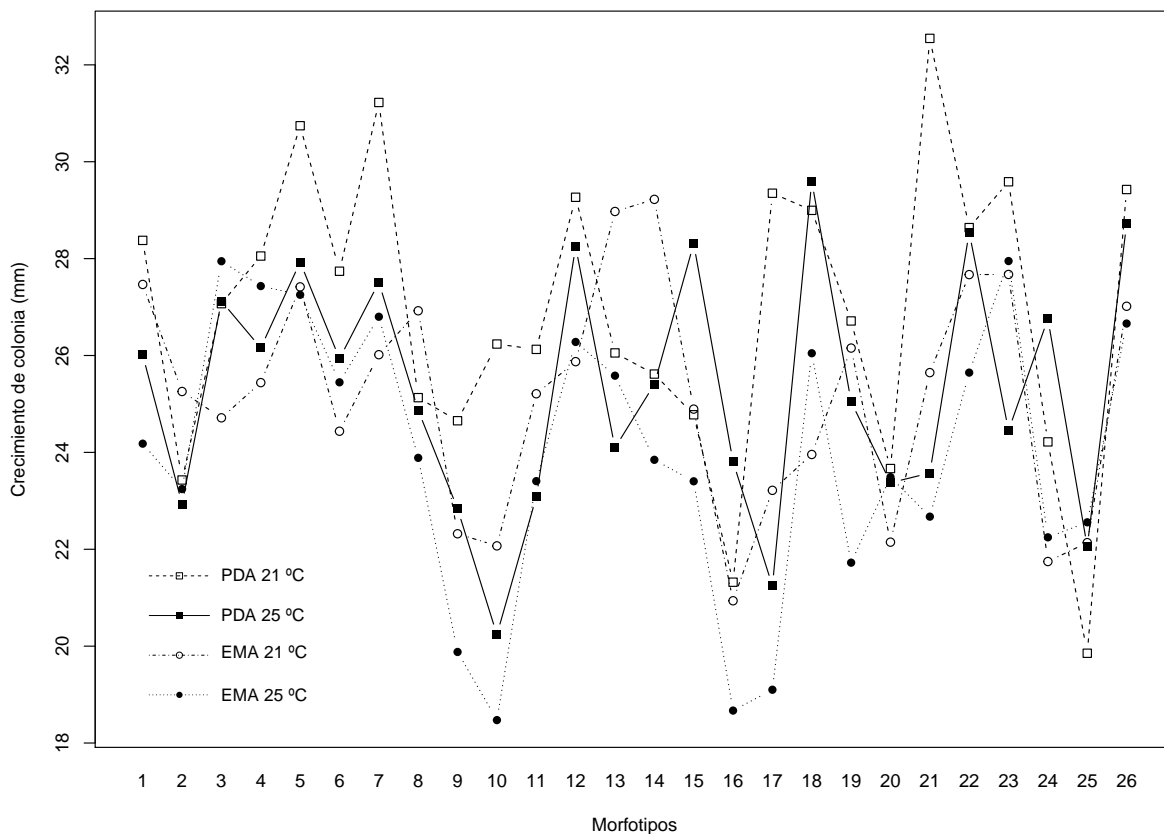


Figura 10. Efecto de la interacción morfotipo: medio de cultivo: temperatura en el crecimiento de colonia (mm) de 26 morfotipos de *Sphaceloma perseae*. Los puntos representan la media de tres repeticiones.

4.3.2 Tasa de crecimiento

La velocidad de crecimiento de las colonias de *S. perseae* expresada como tasa de crecimiento (mm/día) registró valores promedio bajos, más o menos constantes durante las ocho semanas en que se mantuvieron en crecimiento los 26 morfotipos. No se registró en ningún caso picos de crecimiento o fases estacionarias definidas; por el contrario, de manera lenta pero regular todos los morfotipos presentaron avances en el tamaño de colonia observándose diferencias entre morfotipos en función de la combinación medio de cultivo:temperatura (Figura 11).

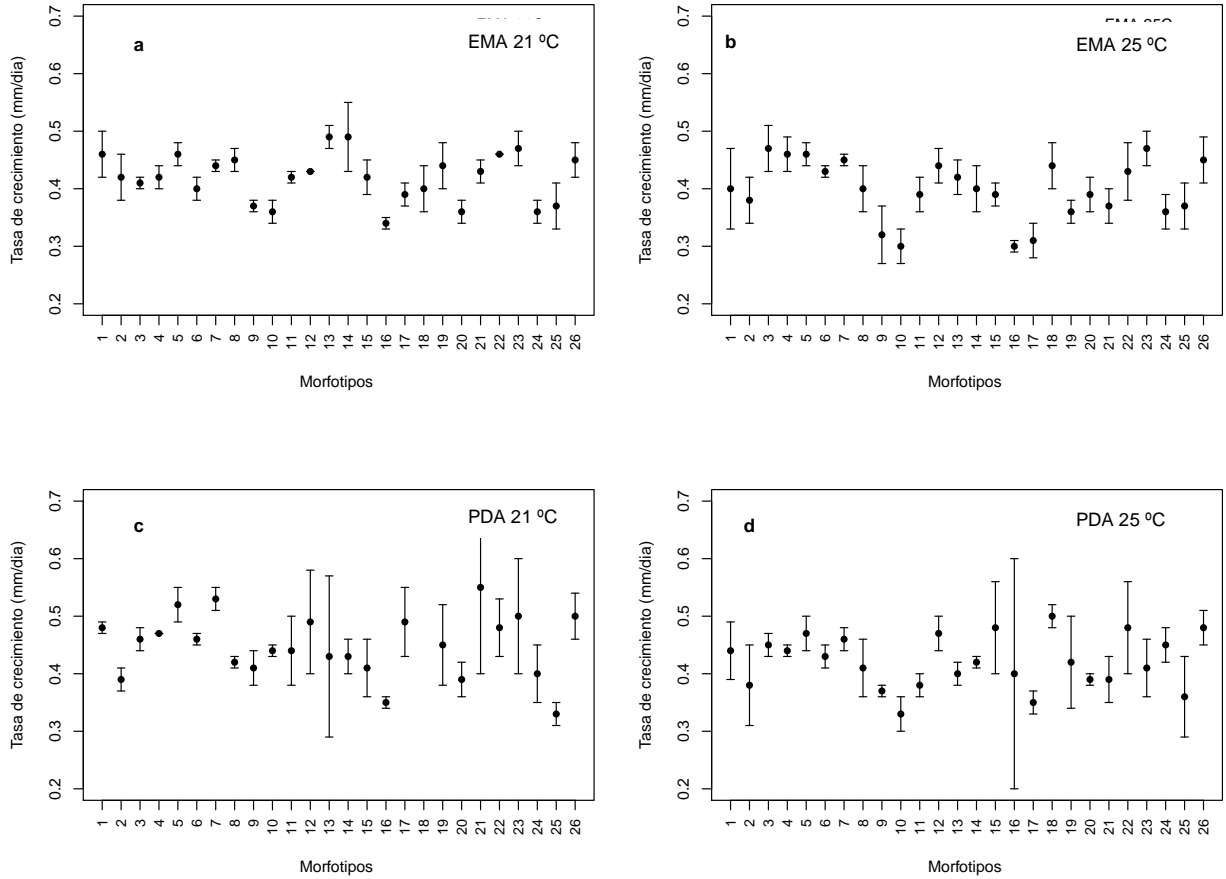


Figura 11. Tasa de crecimiento (mm/día) de 26 morfotipos de *Sphaceloma perseae* en dos medios de cultivo y dos temperaturas. Los puntos representan la media de la tasa de crecimiento de tres repeticiones. Las barras representan la desviación estándar.

El análisis de varianza para la variable tasa de crecimiento de los morfotipos en cada una de las combinaciones medio de cultivo-temperatura indicó diferencias estadísticas significativas en EMA 21 °C, EMA 25 °C y PDA 21 °C, pero no en PDA 25 °C. La comparación de medias (Tukey, 0.05) indicó que existen variaciones en la tasa de crecimiento de los 26 morfotipos y que incluso un mismo morfotipo puede presentar diferencias en la tasa de crecimiento dependiendo de las condiciones de cultivo, por ejemplo, los morfotipos 13 y 14 presentaron la mayor tasa de crecimiento en EMA 21 °C, sin embargo, las tasas de crecimiento más altas en EMA 25 °C las obtuvieron los morfotipos 3, 4, 5, 7, 23 y 26 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de dos medios de cultivo y dos temperaturas en la tasa de crecimiento (mm/día) de 26 morfotipos de *Sphaceloma perseae*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Morfotipo	EMA21°C	EMA25°C	PDA21°C	PDA25°C
1	0.46 abcd	0.40 abcde	0.48 abc	0.44 a
2	0.42 abcdefg	0.38 abcde	0.39 abc	0.38 a
3	0.41 abcdefg	0.47 a	0.46 abc	0.45 a
4	0.42 abcdefg	0.46 a	0.47 abc	0.44 a
5	0.46 abcde	0.46 a	0.52 abc	0.47 a
6	0.40 abcdefg	0.43 abc	0.46 abc	0.43 a
7	0.44 abcdefg	0.45 a	0.53 ab	0.46 a
8	0.45 abcdef	0.40 abcde	0.42 abc	0.41 a
9	0.37 cdefg	0.32 bcde	0.41 abc	0.37 a
10	0.36 efg	0.30 e	0.44 abc	0.33 a
11	0.42 abcdefg	0.39 abcde	0.44 abc	0.38 a
12	0.43 abcdefg	0.44 ab	0.49 abc	0.47 a
13	0.49 a	0.42 abcd	0.43 abc	0.40 a
14	0.49 a	0.40 abcde	0.43 abc	0.42 a
15	0.42 abcdefg	0.39 abcde	0.41 abc	0.48 a
16	0.34 g	0.30 de	0.35 bc	0.40 a
17	0.39 bcdefg	0.31 cde	0.49 abc	0.35 a
18	0.40 abcdefg	0.44 ab	0.49 abc	0.50 a
19	0.44 abcdefg	0.36 abcde	0.45 abc	0.42 a
20	0.36 efg	0.39 abcde	0.39 abc	0.39 a
21	0.43 abcdefg	0.37 abcde	0.55 a	0.39 a
22	0.46 abc	0.43 abc	0.48 abc	0.48 a
23	0.47 ab	0.47 a	0.50 abc	0.41 a
24	0.36 abcdefg	0.36 abcde	0.40 abc	0.45 a
25	0.37 defg	0.37 abcde	0.33 c	0.36 a
26	0.45 abcde	0.45 a	0.50 abc	0.48 a

En el caso de PDA 21 °C el morfotipo 21 presentó la mayor tasa de crecimiento y 22 morfotipos presentaron una tasa de crecimiento muy similar. En el caso de PDA 25 °C estadísticamente todos los morfotipos presentaron tasas de crecimiento similares.

Cuando se sometió a análisis de varianza la tasa de crecimiento de los 26 morfotipos en función de los dos medios de cultivo y las dos temperaturas, se encontró que existía diferencia estadística significativa y que las mayores tasas de crecimiento se presentaron en PDA 21 °C en donde 11 de los morfotipos registraron su mayor tasa de crecimiento, destacando los morfotipos 5, 7 y 21, en tanto que en PDA 25 °C, 10 morfotipos mostraron tasas de crecimiento altas. Por

otra parte, los morfotipos 2, 3, 8, 12 y 14 presentaron las mayores tasas de crecimiento en EMA 21 °C y solo el morfotipo 3 creció más rápido en EMA 25 °C (Figura 12). En términos generales se puede observar que nuevamente PDA 21 °C resultó más adecuado para el crecimiento de *S. perseae*.

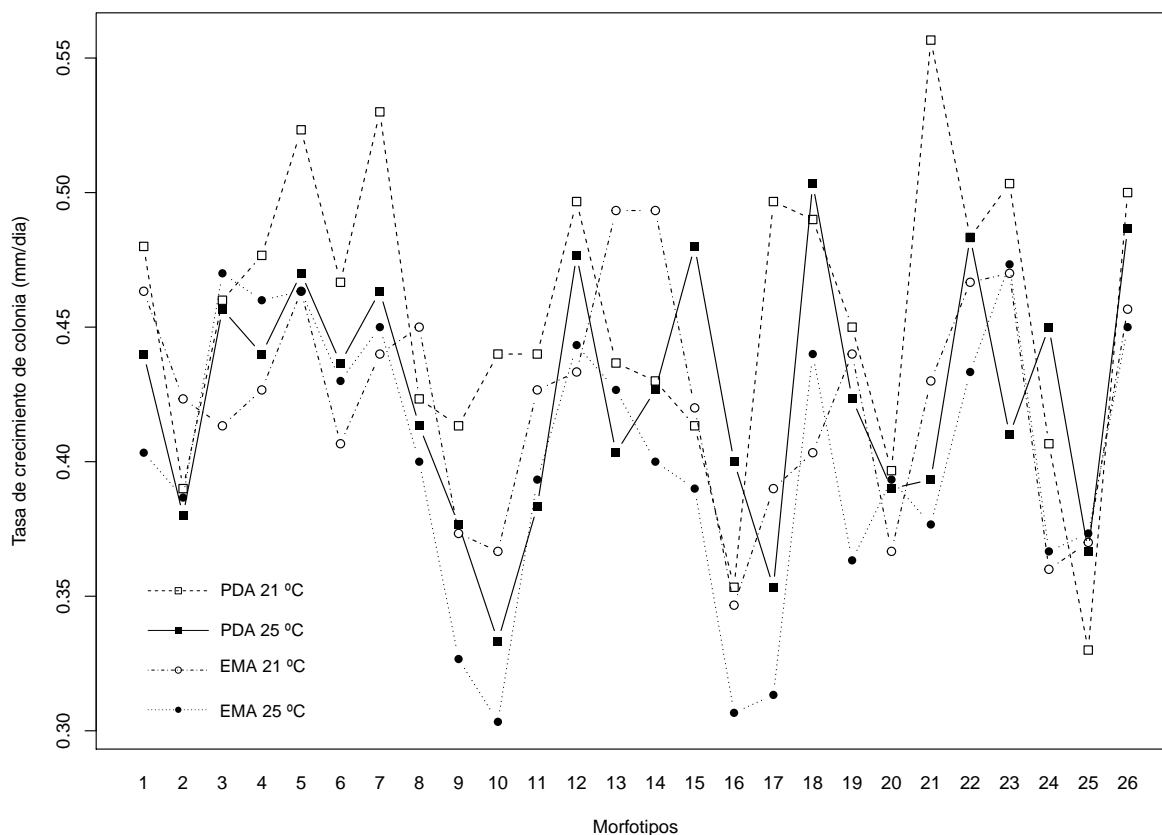


Figura 12. Efecto de la interacción morfotipo: medio de cultivo: temperatura en el crecimiento de colonia (mm) de 26 morfotipos de *Sphaceloma perseae*. Los puntos representan la media de tres repeticiones.

La prueba de medias (Tukey, 0,05) indicó que los morfotipos 5, 26 y 7 fueron los que en general presentaron mejor tasa de crecimiento independientemente del medio de cultivo en que se desarrollaron, seguidos por los morfotipos 22, 23, 12 y 18. El resto de morfotipos se agruparon en cinco grupos diferentes, correspondiendo al morfotipo 16 la tasa de crecimiento más baja (Cuadro 6).

Cuadro 6. Medias de tasa de crecimiento de colonias (mm/día) de 26 morfotipos de *S. perseae* en dos medios de cultivo y dos temperaturas. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Morfotipo	Tasa de Crecimiento	Std	Min	Max	Tukey (0.05)
5	0.480	0.036	0.43	0.56	a
26	0.473	0.040	0.42	0.54	a
7	0.470	0.041	0.42	0.56	a
22	0.466	0.055	0.38	0.54	ab
23	0.464	0.063	0.35	0.62	ab
12	0.462	0.051	0.41	0.59	ab
18	0.459	0.051	0.37	0.52	ab
4	0.450	0.027	0.40	0.50	abc
3	0.450	0.033	0.40	0.50	abc
1	0.446	0.052	0.32	0.51	abcd
13	0.440	0.074	0.28	0.57	abcd
21	0.439	0.102	0.34	0.72	abcd
14	0.437	0.050	0.35	0.56	abcd
6	0.435	0.029	0.38	0.48	abcd
15	0.425	0.055	0.37	0.56	abcd
8	0.421	0.037	0.35	0.47	abcd
19	0.419	0.062	0.34	0.54	abcd
11	0.410	0.041	0.36	0.51	abcd
24	0.395	0.050	0.33	0.48	abcd
2	0.395	0.043	0.31	0.47	abcd
17	0.388	0.078	0.28	0.57	abcd
20	0.386	0.026	0.35	0.43	abcd
9	0.372	0.042	0.29	0.45	bcd
10	0.360	0.057	0.28	0.45	cd
25	0.360	0.047	0.28	0.43	cd
16	0.351	0.096	0.26	0.64	d

4.3.3 Textura y color de *Sphaceloma perseae*

Las variables como textura, color, pigmento en el medio de cultivo se evaluaron al finalizar el experimento de caracterización, esto es a los 56 días posteriores al establecimiento. Las texturas de los aislados fueron coraloide o cerebroide, glutinosa, coremia y farinosa, sin embargo, algunos aislados presentaron dos texturas diferentes en la misma colonia (Figura 13). El color de las colonias de *Sphaceloma perseae* en PDA resultó ser más homogéneo que en MEA, todos los aislados presentaron una ausencia de esporas y escaso o ausente micelio aéreo (Cuadro 7, Figura 14).

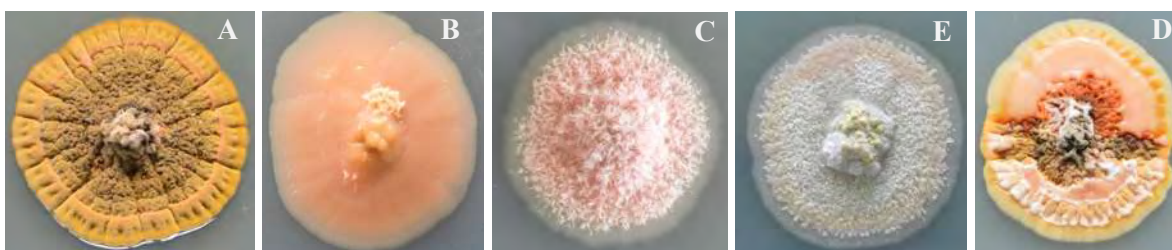


Figura 13. Texturas de *Sphaceloma perseae* en PDA y EMA después de 8 semanas. (A) Coraloide, (B) Glutinosa, (C) Coremia, (D) Farinosa, (E) Doble textura.

Cuadro 7. Características morfo-fisiológicas de 26 morfotipos de *Sphaceloma perseae* obtenidas en dos medios de cultivo y dos temperaturas.

Morfotipo	Medio de cultivo	Crecimiento radial (mm)	Color (código)	Textura	Pigmentación
1	EMA 21°C	27.46	Canela (62)	Coraloide	Amarillo
	EMA 25°C	24.18	Policromatico (128)	Coremia	Amarillo
	PDA 21°C	28.37	Gris humo (105)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	26.01	Rosa buff (61)	Coremia	Sin pigmentación
2	EMA 21°C	25.25	Beige (87)	Farinoso	Amarillo
	EMA 25°C	23.24	Naranja (7)	Coremia	Sin pigmentación
	PDA 21°C	23.43	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	22.93	Rosa buff (61)	Coremia	Rojo
3	EMA 21°C	24.71	Melocoton (4)	Coremia	Sin pigmentación
	EMA 25°C	27.94	Policromatico (128)	Glutinosa	Sin pigmentación
	PDA 21°C	27.07	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	27.12	Rosa buff (61)	Coremia	Sin pigmentación
4	EMA 21°C	25.44	Melocoton (4)	Coremia	Amarillo
	EMA 25°C	27.43	Naranja (7)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 21°C	28.05	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	26.15	Ambar (47)	Coraloide	Amarillo
5	EMA 21°C	27.41	Carne (37)	Coremia	Sin pigmentación
	EMA 25°C	27.25	Melocoton (4)	Coremia	Sin pigmentación
	PDA 21°C	30.74	Policromatico (128)	Dos texturas	Amarillo
	PDA 25°C	27.93	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
6	EMA 21°C	24.43	Melocoton (4)	Dos texturas	Amarillo
	EMA 25°C	25.44	Laud (12)	Coraloide	Sin pigmentación
	PDA 21°C	27.74	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	25.93	Rosa buff (61)	Coremia	Sin pigmentación
7	EMA 21°C	26.01	Melocoton (4)	Coremia	Sin pigmentación
	EMA 25°C	26.80	Carne (37)	Glutinosa	Sin pigmentación
	PDA 21°C	31.22	Gris olivaceo palido (120)	Coraloide	Amarillo
	PDA 25°C	27.51	Avellana (88)	Coremia	Sin pigmentación
8	EMA 21°C	26.92	Melocoton (4)	Dos texturas	Sin pigmentación
	EMA 25°C	23.88	Rosa buff (61)	Glutinosa	Sin pigmentación
	PDA 21°C	25.13	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	24.87	Rosa buff (61)	Coremia	Sin pigmentación

Cuadro 7. Continuación

Morfotipo	Medio de cultivo	Crecimiento radial (mm)	Color (código)	Textura	Pigmentación
9	EMA 21°C	22.32	Policromatico (128)	Coremia	Amarillo
	EMA 25°C	19.88	Carne (37)	Coremia	Sin pigmentación
	PDA 21°C	24.65	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	22.83	Rosa buff (61)	Coremia	Sin pigmentación
10	EMA 21°C	22.07	Carne (37)	Coremia	Sin pigmentación
	EMA 25°C	18.47	Policromatico (128)	Dos texturas	Sin pigmentación
	PDA 21°C	26.23	Azafran (10)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	20.23	Rosa buff (61)	Coremia	Amarillo
11	EMA 21°C	25.21	Naranja (7)	Dos texturas	Sin pigmentación
	EMA 25°C	23.40	Policromatico (128)	Coremia	Sin pigmentación
	PDA 21°C	26.12	Beige (87)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	23.08	Rosa buff (61)	Coremia	Sin pigmentación
12	EMA 21°C	25.87	Azafran (10)	Glutinosa	Sin pigmentación
	EMA 25°C	26.28	Melocoton (4)	Coremia	Sin pigmentación
	PDA 21°C	29.26	Policromatico (128)	Coraloide	Sin pigmentación
	PDA 25°C	28.25	Beige (87)	Coremia	Sin pigmentación
13	EMA 21°C	28.97	Gris olivaceo (107)	Dos texturas	Amarillo
	EMA 25°C	25.58	Ladrillo (59)	Coraloide	Amarillo
	PDA 21°C	26.05	Beige (87)	Dos texturas	Amarillo
	PDA 25°C	24.09	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
14	EMA 21°C	29.22	Policromatico (128)	Coremia	Sin pigmentación
	EMA 25°C	23.84	Rosa buff (61)	Coraloide	Sin pigmentación
	PDA 21°C	25.61	Melocoton (4)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	25.40	Beige (87)	Farinoso	Sin pigmentación
15	EMA 21°C	24.89	Carne (37)	Dos texturas	Amarillo
	EMA 25°C	23.40	Policromatico (128)	Coraloide	Amarillo
	PDA 21°C	24.77	Melocoton (4)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	28.31	Beige (87)	Coraloide	Rojo
16	EMA 21°C	20.93	Rosa vinaceo (58)	Glutinosa	Sin pigmentación
	EMA 25°C	18.67	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 21°C	21.32	Azafran (10)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	23.80	Negro fuscous	Farinoso	Sin pigmentación
17	EMA 21°C	23.21	Melocoton (4)	Coremia	Sin pigmentación
	EMA 25°C	19.10	Policromatico (128)	Coremia	Amarillo
	PDA 21°C	29.35	Melocoton (4)	Farinoso	Rojo
	PDA 25°C	21.24	Rosa buff (61)	Farinoso	Amarillo
18	EMA 21°C	23.95	Carne (37)	Coremia	Amarillo
	EMA 25°C	26.04	Naranja (7)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 21°C	28.99	Melocoton (4)	Farinoso	Amarillo
	PDA 25°C	29.50	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
19	EMA 21°C	26.15	Policromatico (128)	Coraloide	Amarillo
	EMA 25°C	21.72	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 21°C	26.71	Melocoton (4)	Coraloide	Sin pigmentación
	PDA 25°C	25.04	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
20	EMA 21°C	22.14	Carne (37)	Coremia	Amarillo
	EMA 25°C	23.49	Policromatico (128)	Coraloide	Rojo
	PDA 21°C	23.66	Melocoton (4)	Farinoso	Amarillo
	PDA 25°C	23.37	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación

Cuadro 7. Continuación

Morfotipo	Medio de cultivo	Crecimiento radial (mm)	Color (código)	Textura	Pigmentación
21	EMA 21°C	25.64	Carne (37)	Coremia	Amarillo
	EMA 25°C	22.67	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 21°C	32.54	Oxido (39)	Coraloide	Rojo
	PDA 25°C	23.57	Rosa buff (61)	Glutinosa	Sin pigmentación
22	EMA 21°C	27.67	Policromatico (128)	Dos texturas	Amarillo
	EMA 25°C	25.64	Azafran (10)	Glutinosa	Sin pigmentación
	PDA 21°C	28.64	Rosa buff (61)	Farinoso	Amarillo
	PDA 25°C	28.54	Rosa (1)	Farinoso	Sin pigmentación
23	EMA 21°C	27.67	Gris olivaceo (107)	Coraloide	Amarillo
	EMA 25°C	27.95	Laud (12)	Coremia	Sin pigmentación
	PDA 21°C	29.58	Rosa buff (61)	Farinoso	Rojo
	PDA 25°C	24.45	Rosa buff (61)	Farinoso	Amarillo
24	EMA 21°C	21.74	Beige (87)	Farinoso	Amarillo
	EMA 25°C	22.24	Policromatico (128)	Dos texturas	Sin pigmentación
	PDA 21°C	23.43	Azafran (10)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	26.76	Policromatico (128)	Coraloide	Amarillo
25	EMA 21°C	22.13	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	EMA 25°C	22.55	Ladrillo (59)	Dos texturas	Amarillo
	PDA 21°C	19.85	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación
	PDA 25°C	22.05	Coral (38)	Coraloide	Rojo
26	EMA 21°C	27.01	Azafran (10)	Coremia	Amarillo
	EMA 25°C	26.66	Melocoton (4)	Coremia	Sin pigmentación
	PDA 21°C	29.42	Policromatico (128)	Coraloide	Amarillo
	PDA 25°C	28.71	Rosa buff (61)	Farinoso	Sin pigmentación

La columna de color esta determinada por los códigos de color de las tablas de **Rayner (1970)**.

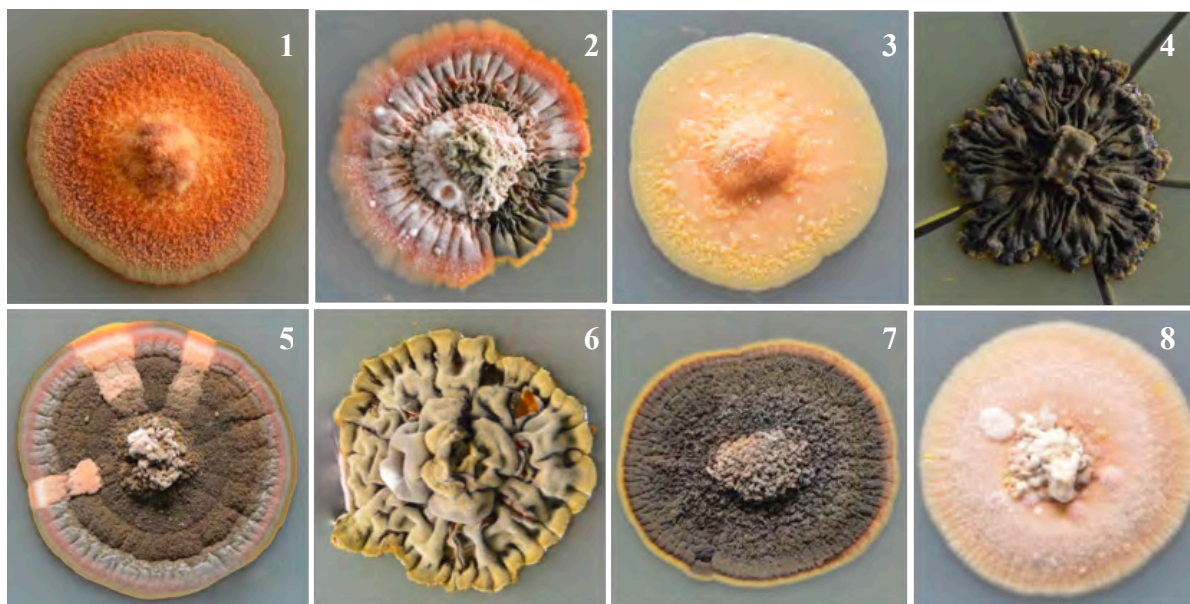


Figura 14. Colonias de *Sphaceloma perseae* en dos medios cultivo a 21 °C y 25 °C después de 8 semanas.



Figura 14. Continuación.

V. DISCUSIÓN

La roña del aguacate es una enfermedad de importancia económica con impacto en el precio de venta del producto. La enfermedad ha sido tema de estudio en México por diversos investigadores (Morales, 2000; Morales, 2017; Robles *et al.*, 2014; Espino *et al.*, 2017) que han tratado temas sobre distribución (Ávila *et al.*, 2003), epidemiología (Téliz y Mora, 2007), y control (Marroquín, 1999; Vidales *et al.*, 2005; Tamayo, 2007; López *et al.*, 2017). Sin embargo, desde el primer reporte por Jenkins (1934), son pocos los estudios sobre el agente causal *Sphaceloma perseae*, destacando los trabajos de Everett (2008 y 2010) quien desarrolló iniciadores específicos basados en la región ITS para la detección de *S. perseae* en Nueva Zelanda; así como el trabajo de Fan *et al.* (2017) que presenta una descripción de la especie, así como sus relaciones filogenéticas con otras especies del género *Sphaceloma* y diferentes aspectos sobre patogenicidad. La ausencia de trabajos basados en el agente causal ha dado lugar a confusiones de diagnóstico ya que otros factores biológicos y físicos pueden generar lesiones en los frutos de aspecto similar a los síntomas de la roña. Así mismo, y como queda demostrado en este trabajo, aislar y obtener cultivos puros de *S. perseae* en medios sintéticos no es tarea fácil, debido al hábito semi biotrófico del hongo y a su localización en el tejido infectado. La obtención de aislados en cultivo axénico ha permitido en este trabajo confirmar la presencia de *S. perseae* en la región productora de aguacate de Michoacán y determinar algunas características morfológicas descriptivas de la especie. Se ha logrado obtener una colección de 450 aislados procedentes de 5 regiones agroclimáticas del estado de Michoacán.

Las especies de *Elsinoe* han sido reportadas en los diferentes continentes, sin embargo, se ha logrado obtener un limitado número de cepas por especie, la mayoría de las especies de este género parecen ser específicas del hospedero (Fan *et al.*, 2017). El problema filogenético más común relacionado con la taxonomía de *Elsinoe* es que muchas especies como *E. ampelina*, *E. australe*, *E. fawcettii* y *E. perseae*, se basan en especímenes muy antiguos y no cuentan con acompañamiento de datos de secuenciación (Jenkins 1925, 1932a, b; Bitancourt y Jenkins, 1936a). Hasta 2014 solo se contaba con 12 cepas disponibles en GenBank para estudios filogenéticos (Jayawardena *et al.*, 2014).

El aislamiento de estos hongos en cultivo axénico ha jugado un papel importante para el conocimiento de la etiología y la taxonomía de *Elsinoe*. En 1939 Bitancourt y Jenkins

describieron el primer procedimiento para aislar a *Elsinoe*, con un gran número de especies aisladas exitosamente. Sin embargo, este protocolo se inicia con ascosporas, las cuales son muy difícil de obtener, por tal motivo este método difícilmente puede ser reproducible (Fan *et al.*, 2017). Los reportes existentes no proporcionan descripciones de los procedimientos para aislar estos microorganismos.

El método de aislamiento descrito en el presente estudio se logró después de varias pruebas utilizando diferentes tiempos de desinfestación y distintos tipos de lesiones de las cuales se debía realizar la siembra. La técnica se perfeccionó hasta lograr aislar a *Sphaceloma* más de cuatro mil veces de frutos sintomáticos procedentes de las diversas zonas productoras de aguacate en Michoacán. Con esto se puede confirmar la hipótesis del presente trabajo y corroborar que el agente causal de la roña del fruto del aguacate es causado por *Sphaceloma perseae*, contrario a lo publicado en los últimos estudios de la roña del aguacate en México, los cuales reportan diversos agentes causales de esta enfermedad en Michoacán. Esto probablemente debido a que en dichos estudios no se dio el tiempo suficiente durante el proceso de aislamiento para que se presentara el desarrollo del micelio de *Sphaceloma* en el medio de cultivo, ya que este presenta una tasa de crecimiento muy baja en comparación con otras especies fúngicas secundarias que se encuentran en este tipo de lesión (Morales, 2000; Morales, 2017; Ávila *et al.*, 2003; Marroquín, 1999).

A pesar de que existen varios estudios sobre algunas especies de *Sphaceloma* y *Elsinoe* asociadas con enfermedades de plantas en diversos países (Jenkins 1932a,b; Bitancourt y Jenkins 1936a; Narasimhan *et al.*, 1969 a,b; Wani y Thirumalachar 1969), los análisis filogenéticos basados en materiales tipo no se llevan a cabo por la falta de colonias y datos de ADN. En el Diccionario de hongos, Kirk *et al.* (2008) reconocieron alrededor de 50 especies en el género *Elsinoe*, aunque hasta la fecha se han descrito más de 140 especies. Elsinoaceae y Myriangiaceae son las dos familias del orden Myriangiales, que acomodan dos y 10 géneros, respectivamente (Dissanayake *et al.*, 2014; Jayawardena *et al.*, 2014). Fan *et al.* (2017) reportaron mediante datos moleculares y morfológicos que se tienen más miembros recientes de la familia Elsinoaceae, dentro del género *Elsinoe* (forma asexual *Sphaceloma*). Los datos moleculares de los géneros en Myriangiaceae son aún incipientes (Swart *et al.*, 2001; Summerell *et al.*, 2006; Crous *et al.*, 2015b, 2016).

En el primer estudio filogenético taxonómico de *Elsinoe* se utilizaron datos de secuencia de la región ITS (Swart *et al.*, 2001). El ITS es una región útil para distinguir la mayoría de las especies de *Elsinoe* (Tan *et al.*, 1996; Swart *et al.*, 2001; Hyun *et al.*, 2007). Everett *et al.* (2010) diseñaron los iniciadores SpF5/R6 que son específicos para la identificación de *Sphaceloma perseae*, los cuales se utilizaron en este estudio como herramienta para confirmar la identidad de los aislados obtenidos de la zona productora de aguacate en Michoacán. Se sometieron a amplificación ciento veinticuatro morfotipos utilizando los iniciadores SpF5/R6 de los cuales, ciento doce dieron como resultado una banda de 250 pb, lo cual permitió confirmar que corresponden a *Sphaceloma perseae*, tal como lo señala Everett *et al.* (2010). Es importante mencionar que los aislados que no amplificaron se conservaron para próximos estudios de identificación.

Este trabajo constituye el primer estudio que evalúa las características morfológicas de poblaciones de *S. perseae*. Aunque muchas especies de *Elsinoe* se describieron en un estudio taxonómico reciente (Fan *et al.*, 2017), no se proporcionó una descripción morfológica de esta especie de *Sphaceloma*. En los resultados aquí obtenidos, las características de la colonia de *S. perseae* variaron entre los aislados, especialmente por los diferentes medios utilizados (PDA y EMA). El mayor crecimiento de las colonias se presentó en el medio de cultivo PDA, a pesar de ser menos utilizado para el aislamiento de *Sphaceloma*. Cheema *et al.* (1978) informaron sobre una variación en el diámetro de la colonia de nueve aislados de *S. ampelinum* sembrados en diferentes medios de cultivo, mientras que Álvarez y Molina (2000) reportaron que el crecimiento de colonias de *S. manihoticola*, el agente causal de la súper elongación de la yuca, era irregular y muy variable entre los diferentes aislamientos.

La tasa de crecimiento es una herramienta fisiológica útil para predecir la habilidad de biocontrol de las cepas de hongos (Uzunovic y Webber, 1998) por lo que es utilizada como una primera referencia al caracterizar cepas nuevas de antagonistas (Hermosa *et al.*, 2000). En microorganismos como *Sphaceloma perseae* es importante conocer la tasa de crecimiento que desarrolla en los diferentes medios de cultivo, para obtener más información acerca de la biología de esta especie, dado que se conoce muy poco. También es importante para realizar técnicas de aislamiento efectivas, ya que está es una de las razones por las cuales no se había logrado aislar con éxito y por tanto no se contaba con material para su estudio.

Los aislados obtenidos en esta investigación mostraron diferentes texturas; coraloide o cerebriforme, tal como se reportó para otras especies del género *Elsinoe* (Bagsic *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2017; Tan *et al.*, 2015), pero también se presentaron texturas glutinosas, farinosas y coremias. Esta última textura no se había reportado en ninguna especie de *Sphaceloma* y se denominó así por los sinemas que presenta la colonia. En otros aislados se pudieron apreciar dos texturas diferentes en una misma colonia, contrario a los resultados obtenidos por Li *et al.* (2018), quienes obtuvieron morfologías idénticas entre aislados de *Sphaceloma ampelina*, en un ambiente cerrado, justificando que la humedad del ambiente cerrado podría influir en la concentración de oxígeno de las placas de PDA. Papagianni (2004) informó sobre resultados similares, y descubrió que la formación de colonias está influenciada por una concentración reducida de oxígeno. Todos estos datos sugieren que la morfología de *Sphaceloma* puede ser sensible a la concentración de oxígeno.

EL aumento de oxígeno también puede favorecer la producción de conidios (Issaly *et al.*, 2005; Tlecuitl *et al.*, 2010). Probablemente esta es la razón por la que no se encontraron conidios de *Sphaceloma perseae* en nuestro estudio, ya que las cajas Petri se mantuvieron cerradas sin incluir ninguna tasa de aireación. La temperatura fue otro factor que quizá no favoreció la producción de conidios de *S. perseae*. Según Houston y Oswald (1946), la producción de conidios a bajas temperaturas es más abundante en otros hongos. Sin embargo, Brook (1973) encontró que la esporulación de *E. ampelina* a 21 °C es favorecida en la naturaleza, dado que se requiere un tiempo mínimo para la producción de conidios en hojas de uva inoculadas.

La relación entre la luz y la esporulación varía con las especies de hongos. Algunos hongos requieren exposición a la luz para la esporulación (Trione y Leach, 1969), otros hongos esporulan mejor en la oscuridad (Cohen *et al.*, 2013). La mayoría de las especies de *Elsinoe* tienen una mayor esporulación en la oscuridad, sin embargo, pueden producir elsinocromos (Weiss, Merlini y Nasini, 1987). Algunos aislados de *S. perseae* tuvieron una producción de elsinocromos pero no fue significativa debido a que los aislados no se mantuvieron en oscuridad constante. *Sphaceloma perseae* resultó tener una variación muy marcada de colores, no se observó ningún patrón de color de colonias entre las diferentes regiones muestreadas y los morfotipos evaluados. Esta parece ser una característica del género, ya que Li y colaboradores (2018) coinciden con estos resultados. Otras características morfológicas de *Sphaceloma*

perseae es que algunas colonias pueden romper el medio y teñirlo, producen micelio aéreo y el micelio contiene gúttulas.

En resumen, este trabajo presenta información sobre la caracterización morfológica y fisiológica de *S. perseae*. La técnica de aislamiento presentada aquí también proporciona un protocolo mejorado y sobre todo reproducible que puede ser útil para otras especies de *Elsinoe*. El resultado más significativo de este estudio fue el aislamiento e identificación molecular de *Sphaceloma perseae*, agente causal de la roña del aguacate, confirmando así su presencia en la zona productora de aguacate de Michoacán. Se estudió el efecto de la temperatura, la luz y dos diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y la morfología de las colonias de *Sphaceloma perseae*, encontrando que existe alta variabilidad entre aislados, lo que sugiere una estructura poblacional diversa. Hacen falta, sin embargo, estudios adicionales para inducir la esporulación de esta especie y abundar en estudios morfológicos y fisiológicos que contribuyan a la tipificación de aislados y a la epidemiología de la enfermedad.

VI. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los procedimientos y condiciones experimentales utilizados en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

Sphaceloma perseae es el agente causal de la roña del aguacate y está presente en las diferentes zonas productoras de aguacate de Michoacán.

Sphaceloma perseae en medio sintético muestra una variación morfológica muy marcada, tanto de color, textura, formación de estructuras y pigmentos.

VII. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology, 5th edn. Burlington. MA: Elsevier Academic Press.
- Alvarez E., Molina ML. 2000. Characterizing the Sphaceloma fungus, causal agent of superelongation disease in cassava. Plant Dis 84:423–428.
- Amorim L, Kuniyuki H. 2005. Doenças da videira. In: Manual de Fitopatologia (Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamim Filho A, Camargo LEA, eds); vol. 2. Ceres, São Paulo: 639–651.
- Anguiano C.J., Alcántar R.J., Toledo B.R., Tapia V.L., Ruíz C.J., Rodríguez C.Y. 2006. Caracterización edafo–climática del área productora de aguacate de Michoacán. INIFAP, Libro Tecnico no. 4. pp 98-195.
- Anonymus. 2007. Growth of hyphae & development of fungi. Available from: bugs.bio.usyd.edu.au/Mycology/Growth_Dev/ hyphalGrowth.shtml.
- Assante G., Locci L., Camarda L., Merlini L., Nasini G. 1977. Screening of the genus Cercospora for secondary metabolites. Phytochemistry 16: 243–247.
- Ávila Q.G.D., Téliz O.D., Mora A.G., Vaquera H.H., Tijerina C.L. 2003. Spatial and temporal dynamic of scab (*Sphaceloma perseae* jenk.) on avocado (*Persea americana* mill). Revista Mexicana de Fitopatología, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 21(002):152-160. Ciudad Obregón, México. <https://www.researchgate.net/publication/242627052>.
- Bagsic, I., Linde, M., y Debener, T. 2016. Genetic diversity and pathogenicity of *Sphaceloma rosarum* (teleomorph *Elsinoë rosarum*) causing spot anthracnose on roses. Plant Pathology, 65, 978–986. <https://doi.org/10.1111/ppa.12478>.
- Bitancourt A.A., Jenkins A.E. 1936a. *Elsinoe fawcettii* the perfect stage of the Citrus scab fungus. Phytopathology 26: 393–395.
- Bitancourt A.A., Jenkins A.E. 1936b. Perfect stage of the Sweet Orange fruit scab fungus. Mycologia 28: 489–492.
- Bitancourt AA, Jenkins AE. 1940. New discoveries of Myriangiales in the Americas. Proceedings of the 8th American Scientific Congress 3:149 – 172.

- Bitancourt AA, Jenkins AE. 1941. Treze novas especies de “Elsinoe” do Brasil. Arquivos do Instituto Biologico de Sao Paulo 12: 1–20.
- Boedijn K.B. 1961. Myriangiales from Indonesia. Persoonia 2: 63–75.
- Brook, P. J. 1973. Epidemiology of grapevine anthracnose caused by *Elsinoe ampelina*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 16, 333– 342. <https://doi.org/10.1080/00288233.1973.10421113>.
- Bruner S.C., Jenkins A.E. 1933. Identity and host relations of the *Elsinoe* of lima bean. Journal of Agricultural Research 47: 783–789.
- Burnett, H. 1974. Avocado scab. Florida Department of Agriculture and Consumer Services Plant Pathology Circular 141: pp2.
- Bu’lock J.D., Detroy R.W., Hostalek Z. y Munim A. 1974. Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Tram Brit Mycology Sot 62: 77-389.
- Carisse O., Morissette-Thomas V. 2013. Epidemiology of grape anthracnose: factors associated with defoliation of grape leaves infected by *Elsinoe ampelina*. Plant Disease 97: 222–230.
- Cheema, S.S., Kapur, S.P., Chohan, J.S., and Jeyarajan, R. 1978. Studies on the cultural and pathogenic variations of *Sphaceloma ampelinum*, the causal organism of the anthracnose disease of grape. Indian Phytopathol., 31:163-166.
- Cheewangkoon R., Groenewald J.Z., Summerell B.A. 2009. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. Persoonia 23: 55–85.
- Chen C.T., Nakanishi K., Natori S. 1966. Biosynthesis of elsinochrome A, the perylenequinone from *Elsinoë* spp. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo) 14: 1434–1437.
- Cohen Y., Vaknin M., Ben-Naim, Y., y Rubin A.E. 2013. Light suppresses sporulation and epidemics of *Peronospora belbahrii*. PLoS ONE, 8, e81282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081282>.
- Crous P.W., Verkley G.J.M., Groenewald J.Z. 2009. Fungal biodiversity. CBS laboratory manual series 1. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands.

- Crous PW, Hawksworth DL, Wingfield MJ. 2015a. Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. *Annual Review of Phytopathology* 53: 247–267.
- Crous P.W., Wingfield M.J., Guarro J. 2015b. Fungal Planet description sheets: 320–370. *Persoonia* 34: 167–266.
- Crous P.W., Wingfield M.J., Burgess T.I. 2016. Fungal Planet description sheets: 469–557. *Persoonia* 37: 218–403.
- De Bary A. 1874. Über den sogenannten Brenner der Reben (Pech) der Reben. *Annalen Oenologie* 4: 165–167.
- Daub, M.E. 1982. Cercosporin, a photosensitizing toxin from *Cercospora* species. *Photopathology*, 72, 370–374.
- Daub, M.E., Herrero, S. and Chung, K-R. 2005. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 252, 197–206.
- Dissanayake A.J., Jayawardena R.S., Boonmee S. 2014. The status of family Myriangiaceae (Dothideomycetes). *Phytotaxa* 176: 219–237.
- Duran N., Song P.S. 1986. Hypericin and its photodynamic action. *Photochemistry and Photobiology* 43: 677–680.
- Engelkes, C.A., Nucló, R.L., y Fravel, D.R. 1997. Effect of carbon, nitrogen, and C:N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. *Phytopathology*, 87:500-505.
- Espino, A.E., Morales G.J.L., Pedraza S.M.E., Chávez B.A.T. Morales M.K.L. 2017. Hongos asociados al síndrome de la roña del aguacate en el estado de Michoacán, México. *Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate*. Ciudad Guzmán, Jalisco, México. p.181.
http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_181.pdf. Consultado mayo 2019.
- Everett, Kerry. 2008. "Pathogen of the Month - July 2008". Australian Plant Pathology Society Inc. Retrieved 20 October 2015.

- Everett, K. R., Rees-George, J., Pushparajah, I. P. S., Manning, M. A., and Fullerton, R. A. 2010. Molecular identification of *Sphaceloma perseae* (Avocado Scab) and its Absence in New Zealand. *J. Phytopathology*. Doi: 10.1111/j.1439-0434-2010.01739. x.
- Fan, X.L., Barreto, R.W., Groenewald, J.Z., Bezerra, J.D.P., Pereira, O.L., Cheewangkoon, Mostert L., Tian C.M., Crous, P.W. 2017. Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoë* (Myriangiales, Dothideomycetes). *Studies in Mycology*, 87, 1–41.
- GIIIA. 2013. El aguacate en Michoacán. Plagas y enfermedades. APEAM A.C.
- Goa L., Sun, M.N., Liu, X.Z., and Che, Y.S. 2007. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycology. Res.* III, p. 87-92.
- Gutiérrez C.M, Lara C.M.B.N., Guillén A.H., y Chávez B.A.T. 2010. Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. *Interciencia*. 35: 647-653.
- Hermosa MR., Grondona I., Iturriaga E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E., and Garcia-Acha, I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology* 66:1890–1898.
- Holliday P. 1980. *Fungal diseases of tropical crops*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hou X., Huang F., Zhang T., Xu J., Hyde D.K., and Li H. 2014. Pathotypes and genetic diversity of Chinese collections of *Elsinoë fawcettii* causing citrus scab. *Journal of Integrative Agriculture*. 13: 1293-1302.
- Houston B.R., y Oswald J.W. 1946. The effect of light and temperature on conidium production by *Helminthosporium gramineum* in culture. *Phytopathology*, 36, 1049–1055.
- Horst R.K. 2013 Spot Anthracnose. In: *Westcott's Plant Disease Handbook*. Springer, Dordrecht. pp 385-388.

- Hui-Ling L. and Kuang-Ren C. 2008. Cellular toxicity of elsinochrome phytotoxins produced by the pathogenic fungus, *Elsinoë fawcettii* causing citrus scab. *New Phytologist* 177: 239–250.
- Hyde K.D., Jones E.B.G., Liu J.K., *et al.* 2013. Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity* 63: 1–313.
- Hyun, J.-W., Timmer, L. W., Lee, S.-C., Yun, S.-H., Ko, S.-W., and Kim, K.-S. 2001. Pathological characterization and molecular analysis of *Elsinoe* isolates causing scab diseases of citrus in Jeju Island in Korea. *Plant Disease* 85:1013-1017.
- Hyun J.W., Peres N.A., Yi S.Y., Timmer L.W., Kim K.S., Kwon H.M., Lim H.C. 2007 Development of PCR assays for the identification of species and pathotypes of *Elsinoe* causing scab on citrus. *Plant Dis* 91:865–870.
- Info Hass. 2016. Información al servicio del aguacatero. URL: <http://www.infohass.net>.
- Issaly N., Chauveau H., Aglevor F., Fargues, J., y Durand, A. 2005. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*, 40, 1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.029>.
- Jahan, N., S. Sultana, S.K. Adhikary, S. Rahman and S. Yasmin, 2013. Evaluation of the growth performance of *Trichoderma harzianum* (Rifai.) on different culture media. *IOSR J. Agric. Vet. Sci.*, 3: 44-50. ^[1]_[5EP]
- Jamadar M.M., Sataraddi A.R., Patil P.V. 2011. Status of pomegranate diseases of Northern Karnataka in India. *Acta Horticulturae* 890: 501–507.
- Jayawardena R.S., Ariyawansa H.A., Singtripop C. 2014. A re-assessment of *Elsinoaceae* (Myriangiales Dothideomycetes). *Phytotaxa* 176: 120–138.
- Jenkins, A. E. 1925a. A species of *Sphaceloma* on avocado. *Phytopathology* 24: 84-85.
- Jenkins A.E. 1925b. The Citrus scab fungus. *Phytopathology* 15: 99 – 104.
- Jenkins A.E. 1931. Lima bean scab caused by *Elsinoe*. *Journal of Agricultural Research* 42: 13–23.

- Jenkins AE. 1932a. Elsinoe on apple and pear. *Journal of Agricultural Research* 44: 689–700.
- Jenkins AE. 1932b. Rose anthracnose caused by *Sphaceloma*. *Journal of Agricultural Research* 45: 321–337.
- Jenkins, A. E. 1934a. *Sphaceloma perseae* the cause of avocado scab. *J. Agric. Res.* 49: 859-869.
- Jenkins, A. E. 1934b. A species of *Sphaceloma* on Avocado. *Phytopathology* 24: 84-85.
- Jenkins A.E. 1947. A specific term for diseases caused by Elsinoe and *Sphaceloma*. *Plant Disease Reporter* 31: 71.
- Jenkins, A.E. and Bitancourt A.A. 1941. A revised description of the genera Elsinoe and *Sphaceloma*. *Mycologia*, 33:338-340.
- Jenkins A.E., Bitancourt A.A. 1957. Studies in the Myriangiales. VII. Elsinoaceae on evergreen *Euonymus*, rose and English ivy. *Mycologia* 49: 95–101.
- Jenkins A.E., Bitancourt A.A., Pollack F.G. 1946. Spot anthracnoses in the United States. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 36: 416–421.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A. 2001. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. 9th edn. CAB International, Wallingford, UK.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C. 2008. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi*, 10th edn. CAB International Mycological Institute, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Kurobane I., Vining L., McInnes A.G., Smith D.G., Walter J.A. 1981. Biosynthesis of elsinochromes C and D. Pattern of acetate incorporation determined by ¹³C and ²H NMR. *Canadian Journal of Chemistry* 59: 422– 430.
- Lasca CC. 1978. Estudios sobre a flora fúngica de sementes de feijao (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biologico* 44: 125–134.
- López E.M.E., Noriega C.D.H., Damián N.A., González M.R., Pereyda H.J., Domínguez M.V.M., Martínez A.U, Cruzaley S.R., Cruz L.B., Salas A.E. 2017. Guía para el manejo integrado del aguacate en altas densidades en el estado de Guerrero. Comité sistema

producto aguacate de Guerrero, A.C. <http://promepca.sep.gob.mx/archivosCA/7186-UAGRO-CA-117-2017-1-57663.pdf> consultado junio 2019.

- Lousberg R.J.J.C, Salemink C.A., Weiss U. 1969a. Pigments of *Elsinoë* species II. Structure of elsinochrome D. *Journal of the Chemical Society (C)*: 1259– 1262.
- Lousberg R.J.J.C., Salemink C.A., Weiss U., Batterham T.J. 1969b. Pigments of *Elsinoë* species II. Structure of elsinochromes A, B and C. *Journal of the Chemical Society (C)*: 1219– 1227.
- Lousberg R.J.J.C, Paolillo L., Kon H., Weiss U. 1970. Pigments of *Elsinoë* species IV. Confirmatory evidence for the structure of elsinochrome A and its ethers from studies of nuclear magnetic resonance (solvent and Overhauser effects) and electron spin resonance. *Journal of the Chemical Society (C)*: 2154–2159.
- Lumbsch H.T., Huhndorf S.M. 2007. Outline of Ascomycota –2007. *Myconet* 13: 1–58.
- Li Y., Wu H., Chen H. 2011. Morphological studies in Dothideomycetes: *Elsinoe* (*Elsinoaceae*), *Butleria*, and three excluded genera. *Mycotaxon* 115: 507–520.
- Li Z, Dang H, Yuan X, He J, Hu Z, Wang X. 2018. Morphological characterization and optimization of conditions for conidial production of *Elsinoë ampelina*, the causal organism of grapevine anthracnose. *J Phytopathol.* 166:420–428. DOI: 10.1111/jph.12702.
- Marroquín P.F.J. 1999. Factores que favorecen la incidencia de roña (*Sphaceloma perseae* jenk.) en el cultivo del aguacate (*Persea americana* mill.) ‘hass’, en tres regiones agroclimáticas de Michoacán, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 309-312. http://www.avocadosource.com/WAC4/WAC4_p309.pdf.
- Mebius H.J., Krabbendam H., Duisenberg A.J.M. 1990. Structure of elsinochrome A. *Acta Crystallographica* C46: 267–271.
- Morales G.J.L. 2000. La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) y la roña (*Sphaceloma perseae* Jenk) del aguacate en Michoacán, México: Epidemiología, predicción y caracterización. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados en Ciencias agrícolas. Texcoco, México.

- Morales G.J.L. 2017. Estado actual de las enfermedades del fruto del aguacate en México: roña y antracnosis. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. Ciudad Guzmán, Jalisco, México. p. 114. http://www.avocadosource.com/Journals/Memorias_VCLA/2017/Memorias_VCLA_2017_PG_114.pdf. Consultado mayo 2019.
- Narasimhan M.J., Wani D.D., Thirumalachar M.J. 1969a. Studies on Elsinoe and Sphaceloma diseases of plants in Maharashtra (India) – II. *Sydowia* 23: 242 – 246.
- Narasimhan M.J., Wani D.D., Thirumalachar M.J. 1969b. Studies on Elsinoe and Sphaceloma diseases of plants in Maharashtra (India) – III. *Sydowia* 23: 247 – 251.
- Nurfitriani R., Fitri W., Anna A.R., Endah Y., and Agung K. 2017. Simple Sequence Repeats (SSR) Marker Screening Related to Orange Fleshed Sweet Potato F1 Genotype Resistance against Scab (*Sphaceloma batatas* Saw.). in 2nd International Conference on Sustainable Agriculture and Food Security: A Comprehensive Approach, KnE Life Sciences, pages 279–286. DOI 10.18502/kls.v2i6.1050.
- Palmateer, A. 2006. Description of *disease*: Avocado scab. In: Evans EA. (ed) Avocado Technical Assistance Curriculum. Homestead, FL, USA, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, pp 77.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22, 189–259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Passerini G. 1881. Erbario crittogamico italiano 2. JStor Plant Science, Italy.
- Pernezny, K., Marlatt, R. 2007. Diseases of avocado in Florida. Bulletin Florida Cooperative Extension Service PP21:3.
- Phillips AJL. 1994. A comparison of methods for inoculating bean plants with *Elsinoe phaseoli* and some factors affecting infection. *Annals of Applied Biology* 125: 97–104.
- Poolsawat O., Tharapreuksapong A., Wongkaew S., y Tantasawat T. 2009. Cultural characteristics of *sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media. *Suranaree J. Sci. Technol.* 16(2):149-157.

- Poolsawat O., Tharapreuksapong A., Wongkaew S. 2010. Genetic diversity and pathogenicity analysis of *Sphaceloma ampelinum*, causing grape anthracnose in Thailand. *Journal of Phytopathology* 158: 837–840.
- Raciborski M. 1900. Parasitische Algen und Pilze Java's I. Botanischen Institut zu Buitenzorg, Batavia.
- Rademacher W., Jung J., Laatsch H., Rave-Frank M., Hedden P and Graebe JE. 1982. Production of gibberellin A4 and other GAS by the fungus *Sphaceloma manihoticola*. In: Abstracts of the Eleventh International Conference on Plant Growth Substances, Aberystwyth, July 12-16.1982, p. 8.
- Rave-Frank M. 1980. Gibberellinproduktion bei *Sphaceloma manihoticola*. Diploma Thesis, University of Göttingen.
- Rayner RW. 1970. A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- R Core Team. 2014. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Robles Y.L., Téliz O.D., Nieto Á.D., Nava D.C., y Marroquín P.F.J. 2014. Hongos asociados al síntoma de roña en frutos de aguacate en el estado de Michoacán. Memorias del XVI Congreso Internacional y XLI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Ixtapan de la Sal, Estado de México, México. 32: S65. http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen322014/Integrado/SUPLEMENTOINTEGRADO_32_2014.pdf. Consultado mayo 2019.
- Santos R.F., Ciampi-Guillard M., Amorim L., Massola Júnior, N.S., Spósito, M.B. 2017. Aetiology of anthracnose on grapevine shoots in Brazil. *Plant Pathology*, 67, 692–706. <https://doi.org/10.1111/ppa.12756>.
- Santos R.F., Spósito M.B., Ayres M.R., Sosnowski M.R. 2018. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Elsinoë ampelina*, the causal agent of grapevine anthracnose in Brazil and Australia. *J Phytopathol.* 166:187–198. DOI: 10.1111/jph.12675.

- Scheper R.W., Wood P.N., Fisher B.M. 2013. Isolation, spore production and Koch's postulates of *Elsinoë pyri*. *New Zealand Plant Protection* 66: 308–316.
- Shear C.L. 1929. The life-history of *Sphaceloma ampelinum* de Bary. *Phytopathology* 19: 673–679.
- Shirasugi N., Misaki A. 1992. Isolation, characterization, and antitumor activities of the cell wall polysaccharides from *Elsinoë leucospila*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56: 29–33.
- SIAP. 2017. Producción Agrícola. URL: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>. Consultado junio 2018
- Sivanesan A. 1984. The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs.
- Starback K., 1899. Ascomyceten der ersten Regnellschen Expedition 1. *Bihang till Kungliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar* 25: 1–68.
- Stevens H. 1918. Avocado scab. *Florida Agricultural Experiment Station Bulletin* 289:2.
- Stierle A.C., Cardellina J.H. 1989. Phytotoxins from *Alternaria alternata*, a pathogen of spotted knapweed. *Journal of Natural Products* 52: 42–47.
- Summerell B.A., Groenewald J.Z., Carnegie A. 2006. Eucalyptus microfungi known from culture. 2. *Alysidiella Fusculina* and *Phlogicylindrium* genera nova with notes on some other poorly known taxa. *Fungal Diversity* 23: 323–350.
- Swart, L., Crous, P.W., Kang, J.C., Mchau, G.R.A., Pascoe, I. & Palm, M.E. 2001. Differentiation of species of *Elsinoë* associated with scab disease of Proteaceae based on morphology, symptomatology, and ITS sequence phylogeny. *Mycologia* 93: 366–379. <http://dx.doi.org/10.2307/3761658>.
- Tamayo M.P.J. 2007. Enfermedades del Aguacate. *Politécnica No4*. Medellín. pp. 51-70.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

- Tan M.K., Timmer L.W., Broadbent P., et al. 1996. Differentiation by molecular analysis of *Elsinoe* sp. causing scab disease of Citrus and its epidemiological implications. *Phytopathology* 86: 1039–1044.
- Téliz, D. Mora, A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. Editorial Mundiprensa, México 2da edición. 219-321 p.
- Tlecuitl B.S., Viniegra G.G., Díaz G., y Loera, O. 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*, 169, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>.
- Tormo M.R. 2014. Plantas y hongos. Universidad de Extremadura. Recuperado de <http://www.plantasyhongos.es/referencias/autor.htm>.
- Trione E.J., y Leach C.M. 1969. Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. *Phytopathology*, 59, 1077–1083.
- Uzunovic A. and Webber J.F. 1998. Comparison of bluestain fungi grown in vitro and in fresh cut pine biiiets. *European Journal of Forestal Pathology*. 28: 323–334.
- Vidales J.A., Contreras J.A., Coria V.M., Alcántar J.J. 2005. Control de la roña del aguacate. Uruapan: Sagarpa.
- Wani D.D., Thirumalachar M.J. 1969. Studies on *Elsinoe* and *Sphaceloma* diseases of plants in Maharashtra (India)-IV. *Sydowia* 23: 252–256.
- Wani D.D., Thirumalachar M.J. 1970. Studies on *Elsinoe* and *Sphaceloma* diseases of plants in Maharashtra State (India)-VII. *Sydowia* 24: 317 – 321.
- Weiss, U., Flon, H. and Burger, W.C. 1957. The photodynamic pigment of some species of *Elsinoë* and *Sphaceloma*. *Arch. Biochem. Biophys.* 69, 311– 319.
- Weiss, U., Ziffer, H., Batterham, T.J., Blumer, M., Hackeng, W.H.L., Copier, H. and Salemink, C.A. 1965. Pigments of *Elsinoë* species I. Pigment pro- duction by *Elsinoë* species: isolation of pure elsinochromes A, B, and C. *Can. J. Microbiol.* 11, 57–66.

- Weiss, U., Merlini, L. y Nasini, G. 1987. Naturally occurring perylenequinones. In: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W. and Tamm, C., eds), pp. 2–71. New York: Springer- Verlag.
- White TJ, Bruns T, Lee S, et al.1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications 18: 315–322.
- Wingfield MJ, De Beer ZW, Slippers B, et al. 2012. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. Molecular Plant Pathology 13: 604 – 613.
- Woo, K. K., Wook, H. J., Woo, P. E. 2004. Cytology of cork layer formation of citrus and limited growth of *Elsinoe fawcettii* in scab lesions. European Journal of Plant Pathology 110: 129-138.
- Woronichin NN. 1914. Plectodiscella piri, der Vertreter einer neuen Ascomyceten-Gruppe. Mykologisches Zentralblatt 4: 225–233.
- Xiao-Hui Z., Yan-Yu Y., Biao X. 2004. Pathogen of pomegranate Sphaceloma scab. Journal of Yunnan Agricultural University 19: 498–499 (translated from Manderin).
- Yamazaki, S., Okube, A., Akiyama, Y. and Fuwa, K. 1975. Cercosporin, a novel photodynamic pigment isolated from *Cercospora kikuchii*. Agric. Biol. Chem. 39:287–288.
- Yoshihara T., Shimanuki T., Araki T., Sakamura S. 1975. Phleichrome, a new phytotoxic compound produced by *Cladosporium phlei*. Agricultural and Biological Chemistry 39: 1683–1684.