

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida
con orientación en Microbiología celular y molecular**

***Hongos asociados a enfermedades de la madera en nogal
(Carya illinoensis) en el noroeste de México***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Karen Berenice Torres Valenzuela

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Karen Berenice Torres Valenzuela

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de tesis

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Dr. Daniel Saucedo Carvajal

Dra. Edelweiss Airam Rangel Montoya



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Karen Berenice Torres Valenzuela** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida [con orientación en Microbiología Celular y Molecular](#)

Hongos asociados a enfermedades de la madera en nogal (*Carya illinoensis*) en el noroeste de México

Resumen aprobado por:

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de tesis

En el norte de México la producción de nuez pecana representa una actividad económica muy importante. A nivel mundial nuestro país se posiciona como principal productor, con los estados de Chihuahua y Sonora representando el 80% de la producción nacional. En años recientes, en Sonora se han observado síntomas de enfermedades de la madera en árboles de nogal pecanero (*Carya illinoensis*). Las enfermedades de la madera son un complejo de enfermedades causadas por hongos, cuyos principales síntomas son lesiones necróticas, hendiduras del tejido lignificado conocidas como canchros, y muerte regresiva en brotes y ramas, que afectan la producción del año siguiente. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia e identidad de los hongos causantes de estas enfermedades en Sonora, México. Para esto, se realizó un muestreo en once huertas del estado de Sonora y a partir de tejido necrótico se llevó a cabo el aislamiento de hongos. Se obtuvieron más de 100 cepas, de las cuales se seleccionaron 50 por su morfología colonial y se caracterizaron fenotípica y molecularmente usando los marcadores del factor de elongación 1 alpha (*tef1- α*), y la región del espaciador transcrito interno (ITS). Con base en ello, se identificaron las especies *Pseudofusicoccum stromaticum*, *Lasiodiplodia gilaniensis*, *L. brasiliensis*, *Diaporthe caatingaensis* y *Eutypella microtheca*. Las mayores lesiones en nogal fueron producidas por *Lasiodiplodia* spp. seguida de *P. stromaticum* y *E. microtheca*. En contraste, *D. caatingaensis* produjo lesiones ≤ 2 cm. Por otro lado, la temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las cepas fue de 30°C. Ninguna de las cepas evaluadas creció a 40°C, y solamente *P. stromaticum*, *E. microtheca* y *Lasiodiplodia* sp. mostraron poco crecimiento a 37°C. Los datos obtenidos contribuyen a expandir el conocimiento del estatus fitosanitario de las huertas de nogal en Sonora y sirven como base para establecer programas de manejo de los hongos identificados.

Palabras clave: Nuez pecana, enfermedades fúngicas, Botryosphaeriaceae, cancro por Botryosphaeria

Abstract of the thesis presented by **Karen Berenice Torres Valenzuela** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in **Molecular and Cellular Microbiology**

Fungi associated with trunk diseases of pecan (*Carya illinoensis*) in the northwestern of Mexico

Abstract approved by:

Dra. Rufina Hernández Martínez
Thesis Director

In northern Mexico, pecan nut production represents a very important economic activity. Worldwide, our country is positioned as the main producer and the states of Chihuahua and Sonora contribute with 80% of the national production. In recent years, symptoms of wood diseases have been observed in pecan trees (*Carya illinoensis*) in Sonora. Trunk diseases are a complex of diseases caused by fungi, whose main symptoms are necrotic lesions in the xylem, clefts of the lignified tissue known as cankers, and dieback on shoots and branches, which affect the following year's production. Until now there are no reports of the causal agents responsible for this symptomatology in pecan nuts in Mexico. The objective of this work was to determine the presence and identity of the fungi that cause these diseases in Sonora, Mexico. For this, a sampling was carried out in eleven orchards in the state of Sonora, and from necrotic tissue fungi were isolated in PDA medium. More than 100 strains were obtained. Based on their colonial morphology 50 of them were selected and characterized phenotypically and molecularly using the elongation factor 1 alpha (*tef1- α*) and the internal transcribed spacer (ITS) region as markers. The analyses identified the species *Pseudofusicoccum stromaticum*, *Lasiodiplodia gilaniensis*, *L. brasiliensis*, *Diaporthe caatingaensis* and *Eutypella microtheca*. The largest lesions in two-years-old pecan trees were produced by *Lasiodiplodia* spp. followed by *P. stromaticum* and *E. microtheca*. In contrast, *D. caatingaensis* produced lesions ≤ 2 cm. On the other hand, the optimum growth temperature for most of the strains was 30°C. None of the tested strains grew at 40°C, and only *P. stromaticum*, *E. microtheca* and *Lasiodiplodia* sp. showed little growth at 37°C. The data obtained here contribute to expand our knowledge of the phytosanitary status of pecan nut orchards in Sonora and serve as the basis for establishing management for the control of the identified fungi.

Keywords: Pecan tree, Botryosphaeriaceae, fungal diseases, Botryosphaeria canker

Dedicatoria

A la gente que me rodea y me guía para seguir adelante.

A mis padres Armando y Oralia por ser mi mayor motivación en la vida, por el amor y paciencia que me brindan. Por confiar en mí siempre, darme ánimos y las herramientas para seguir adelante

A mis hermanos, Xóchitl y Armando por siempre hacerme reír y estar a mi lado. A mis sobrinos-ahijados Armandito y Paulita porque son mi razón de sonreír y mi felicidad entera.

A Ricardo por siempre darme ánimos, apoyo y comprensión cuando lo necesito, por acompañarme al concluir la preparatoria, universidad y ahora la maestría.

A Desenia “yesi” que siempre me dió muchos ánimos, me hacía reír y me dió compañía mientras estudiaba.

A mi abuelita Hilda porque siempre escuchó todas mis pláticas de la tesis.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por brindarme la oportunidad de seguir avanzando con mi formación profesional en el programa de Maestría en Ciencias de la Vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada durante la realización del posgrado

A la Dra. Rufina por la confianza que me brindó desde el principio y a lo largo de la maestría, por su conocimiento y enseñanzas durante este tiempo. Gracias por sus consejos y paciencia durante la última etapa, por enseñarme el camino a concluir esta etapa.

A los miembros de mi comité de tesis, gracias a la Dra. Meritxell, Dra. Edelweiss y al Dr. Daniel, por su disponibilidad, comprensión y apoyo en mejorar este proyecto con sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio, Carmen por siempre ser mi amiga dentro y fuera del laboratorio, por las risas que compartimos y tus consejos de apoyo en todo momento, fuiste un gran apoyo y pilar, ¡estoy segura de que eres una persona que llegará muy lejos! A Edel que siempre me brindó su conocimiento y consejos para cada etapa de este proyecto desde el comienzo hasta el final, siempre enseñándome el camino correcto a realizar cada experimento y por todo lo que me enseñaste.

A mis mejores amigos Katia, Francisco y Jacqueline por siempre escucharme, gracias por estar a mi lado desde el principio hasta el final de esta etapa. Especialmente a Jacqueline que juntas decidimos entrar a continuar nuestra formación profesional y académica, por todo el apoyo que nos brindamos especialmente durante los avances de tesis.

A todos mis amigos y familiares que me motivaron a seguir con mis estudios.

Al equipo de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Hermosillo, Sonora (JLSVH), especialmente al presidente, Ing. Agustino Baranzini Coronado y al gerente el Ing. Francisco Carmelo Silva Sánchez.

Al Ing. Edgardo Urías García, asesor técnico de nogal, por todas las facilidades que nos otorgó para la realización de este trabajo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Generalidades del nogal.....	2
1.1.2 Producción e importancia económica.....	2
1.1.3 Enfermedades del nogal.....	2
1.1.4 Enfermedades de la madera en nogal	3
1.2 Justificación	4
1.1 Hipótesis.....	4
1.1 Objetivos	5
1.1.1 Objetivo general	5
1.1.2 Objetivos específicos.....	5
Capítulo 2. Metodología.....	6
2.1 Análisis de lesiones en maderas de nogal pecanero en laboratorio.....	7
2.2 Aislamiento fúngico y mantenimiento de cepas.....	8
2.3 Caracterización morfológica.....	8
2.4 Extracción de ADN y amplificación por PCR de los fragmentos conservados para la identificación molecular de cepas.....	9
2.5 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de los aislados seleccionados	10
2.6 Análisis filogenético de cepas seleccionada de nogal pecanero	10
2.7 Pruebas de patogenia de cepas fúngicas obtenidas de nogal pecanero	11
Capítulo 3. Resultados	12
3.1 Muestreo	12
3.2 Características de aislados fúngicos identificados en este estudio	13

3.2.1	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	13
3.2.2	<i>Lasiodiplodia</i> spp.....	17
3.2.3	<i>Diaporthe caatingaensis</i>	20
3.2.4	<i>Eutypella microtheca</i>	22
3.2.5	<i>Fusarium</i> spp.....	24
3.2.6	Otros aislados.....	27
3.3	Temperatura óptima de crecimiento.....	28
3.4	Pruebas de patogenia.....	28
Capítulo 4.	Discusión.....	31
Capítulo 5.	Conclusiones	35
Literatura citada		36

Lista de figuras

Figura	Página
1. Ubicación huertas de muestreo en municipio de Hermosillo.....	6
2. Muerte regresiva en árboles de Nogal en el noroeste de México.....	7
3. Síntomas observados en la madera de los árboles de nogal en el municipio de Hermosillo ..	7
4. Lesiones necróticas en la madera observados durante el procesamiento de muestras	12
5. Morfotipos observados en las cepas seleccionadas	13
6. Características de las colonias de <i>P. stromaticum</i>	15
7. Morfología de conidios y células conidiógenas de <i>P. stromaticum</i>	15
8. Análisis filogenético de las cepas de <i>Pseudofusicoccum</i>	17
9. Características de las colonias <i>L. brasiliensis</i> (M5T3) y <i>L. exigua</i> (M2T2)	18
10. Características del género <i>Lasiodiplodia</i> , conidios ovalados, pigmento marrón oscuro y con septo.....	18
11. Análisis filogenético cepas del género <i>Lasiodiplodia</i>	19
12. Características de las colonias de <i>Diaporthe caatingaensis</i>	20
13. Morfología de conidios de <i>Diaporthe caatingaensis</i>	20
14. Análisis filogenético de cepas del género <i>Diaporthe</i>	21
15. Características de las colonias de <i>Eutypella microtheca</i> , cepa M4T2B.....	23
16. Análisis filogenético de cepas de <i>Eutypella</i>	23
17. Crecimiento en medio PDA de <i>Fusarium</i> spp.....	24
18. Análisis filogenético de cepas del género <i>Fusarium</i>	26
19. Morfotipos observados de otros géneros no causantes de enfermedades de madera	27
20. Resumen de los géneros de hongos encontrados por huertas.....	27
21. Lesiones en la madera de plantas de nogal pecanero inoculadas con hongos aislados en este estudio.....	29
22. Lesiones causadas en tallos de nogal pecanero por once cepas de hongos seleccionadas. .	30

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Lista de huertas de nogal y su ubicación de donde se obtuvieron las muestras analizadas en este estudio.....	8
2. Lista de cepas seleccionadas de las huertas en este estudio.....	14
3. Dimensiones de las conidiósporas de cepas de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> identificadas en este estudio.....	16
4. Lista de números de acceso GeneBank de <i>Pseudofusicoccum</i> spp. usados en este estudio para análisis filogenético	16
5. Dimensiones de conidiósporas de cepas pertenecientes a <i>Lasiodiplodia</i> spp. en este estudio	19
6. Lista de números de acceso GeneBank de <i>Diaporthe</i> sp. usados en este estudio para el análisis filogenético.....	22
7. Lista de números de acceso GeneBank de <i>Eutypella</i> sp. usados en este estudio para análisis filogenético.....	24
8. Lista de números de acceso GeneBank de <i>Fusarium</i> spp. usados en este estudio para análisis filogenético.....	25
9. Crecimiento micelial a diferentes temperaturas de nueve cepas fúngicas seleccionadas (mm/día).	28

Capítulo 1. Introducción

El nogal (*Carya illinoensis*) tiene como fruto la nuez pecanera, una de las nueces con gran demanda internacional, debido a los beneficios que tiene en la salud humana tales como reducir los riesgos de padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Kris-Etherton et al., 2008), la demanda de nuez ha aumentado su producción. Entre los años 2010 y 2019, México aumentó su volumen de producción a más de 100 mil toneladas. México lidera la producción de nuez pecanera junto con Estados Unidos, contribuyendo con el 49% de la producción mundial (Briceño-Contreras et al., 2019).

En México las huertas de nogal tienen una extensión de aproximadamente 145 mil ha, con una producción total de 165,000 ton, valoradas en el 2021 en \$11, 992 millones de pesos. La producción se concentra principalmente en los estados de Chihuahua, Sonora y Coahuila, los cuales suman el 90% de la producción nacional (SIAP, 2021).

Como todo cultivo, el rendimiento del nogal puede verse afectado por una variedad de factores que disminuyen la calidad y cantidad de fruto. Uno de estos factores son las enfermedades. Dentro ellas, las ocasionadas por hongos son de las más importantes, especialmente las que afectan a la madera. Las enfermedades de la madera en nogal son un gran problema fitosanitario en las huertas, ya que deterioran diferentes partes de la planta hasta provocar su muerte (Chen et al., 2013). En diversas partes del mundo se ha reportado la presencia de miembros de la familia Botryosphaeriaceae y *Diaporthe* spp. asociados a enfermedades de la madera en diferentes cultivos de nueces (Chen et al., 2014a). La penetración de estos hongos comienza por heridas provocadas, principalmente por las herramientas de poda. Los hongos más importantes que ocasionan estas enfermedades son los de la familia Botryosphaeriaceae (Moral et al., 2019). Estos hongos penetran la madera provocando lesiones internas y externas y síntomas como tejido necrótico en el tronco, muerte de brazos, pudriciones, caída de hojas, canchales, tizones y muerte regresiva (Li et al., 2016).

En Sonora, México se pueden observar plantas con muerte regresiva y canchales en la madera, pero no se tiene conocimiento de que hongos se encuentran presentes en las huertas de nogal. Por ello, en este trabajo se realizó un estudio de los agentes causales de enfermedades asociadas a la madera en huertas de nogal en la Costa de Hermosillo, México, con el fin de aportar conocimiento sobre los agentes causales que permita establecer un programa de manejo.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades del nogal

El árbol de nogal pecanero (*Carya illinoensis*) forma parte de la familia Juglandácea, la cual incluye a una gran variedad de especies de árboles caducifolios. El nogal pecanero puede alcanzar una altura de 60 m en sus regiones nativas, un diámetro de más de 2 m y llegar a edades mayores de los 100 años (Alasalvar and Shahidi, 2008). Es un árbol de follaje espeso en su etapa adulta y posee un tronco robusto de color gris claro. El fruto es una drupa cubierta con una capa verde llamada ruezno, la cual al madurar cambia a una tonalidad negra, se abre y deja al descubierto lo que conocemos como nuez.

1.1.2 Producción e importancia económica

Las principales regiones productoras de nuez en México se encuentran en la zona del noroeste. Los principales estados son Chihuahua con un 61% de la producción nacional, Sonora con el 17% y Coahuila con el 12% (SIAP, 2021). En 2021 México ocupó el cuarto lugar como productor mundial de nueces, siendo China el principal productor en variedad nuez castilla. México lideró la producción mundial de nuez variedad pecana junto con Estados Unidos, con una participación del 49% (Ortiz-Quezada et al., 2011).

La producción de nuez en México es económicamente muy importante ya que se encuentra en la lista de los principales productos agrícolas de exportación. En 2020 la exportación de nuez se cotizó en \$658 millones de dólares, siendo un total de 88,617 toneladas de nueces exportadas, lo cual representa el 81% de la producción del país, exportando principalmente hacia Estados Unidos. El valor total de la cosecha en México en 2021 estuvo valorado en \$11, 992 millones de pesos (SIAP, 2021).

1.1.3 Enfermedades del nogal

El rendimiento de la producción de nuez pecana y su calidad pueden verse afectados por la edad del árbol, su nutrición, diversas plagas y una variedad de enfermedades. En el caso de las plagas se encuentran el gusano barrenador de la nuez (*Acrobasis nuxvorella*) y el gusano barrenador del ruezno (*Cydia Caryana* Fitch). Este último representa la plaga económicamente más importante, ya que afecta el crecimiento y el llenado de la nuez, y actualmente se recurre al uso de insecticidas para su control (Gallegos Antonio, 2016).

Las huertas de nogal también son afectadas por hongos. En México existen reportes de hongos causantes de enfermedades foliares, como *Mycosphaerella caryigena*, responsable de la mancha vellosa, que ocasiona defoliación del árbol; mientras que *Fusicladium effusum*, es causante de la costra (Samaniego-Gaxiola et al., 2015). El manejo de estas enfermedades se realiza por medio de fungicidas preventivos y variedades resistentes.

1.1.4 Enfermedades de la madera en nogal

Las enfermedades causadas por hongos que afectan a la madera suelen ser más severas y difíciles de tratar, ya que una vez iniciado el proceso de infección ocasionan diferentes síntomas hasta deteriorar por completo la madera e incluso matar el árbol. En conjunto estas patologías se conocen como enfermedades de la madera. Anteriormente estas enfermedades no se consideraban importantes, pero en los últimos años se ha observado un aumento de síntomas tales como canchales, tizón y muerte regresiva en los lugares donde se cultiva nogal, incluidos Estados Unidos, España y otros países del Mediterráneo. Los hongos involucrados en estas sintomatologías pueden afectar hasta el 30% de la producción de nuez, cuando no se controlan (Moral et al., 2019).

Alrededor del mundo se han reportado varias especies de hongos que ocasionan enfermedades de la madera en nogal. De entre ellas destacan varios miembros de la familia Botryosphaeriaceae, una familia grande de hongos filamentosos con una distribución cosmopolita que se compone de 26 géneros (Phillips et al., 2013). A la fecha se sabe que hongos de los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* y *Macrophomina* son patógenos de árboles de nueces (Chen et al., 2014).

Alrededor del mundo se han reportado 20 especies de la familia Botryosphaeriaceae asociadas a cultivos de nueces (Moral et al., 2019b). Las huertas de nuez castilla en EUA, España e Irán están siendo afectadas por 12 especies de Botryosphaeriaceae: *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Dothiorella iberica*, *Lasiodiplodia citricola*, *L. theobromae*, *Neofusicoccum luteum*, *N. mediterraneum*, *N. nonquaesitum*, *N. parvum*, *N. vitifusiforme* y *Neoscytalidium dimidiatum*; y dos especies de *Diaporthe*: *D. neotheicola* y *D. rhusicola* (Chen et al., 2014). En Brasil el cancro del tallo es causado por *Lasiodiplodia subglobosa* (Poletto et al., 2016), *N. parvum* y *Pseudofusicoccum kimberleyense* (Rolim et al., 2020).

El conocimiento de los agentes causales de enfermedades de la madera ayuda a reducir las infecciones, integrando la aplicación de fungicidas con prácticas culturales. Por ejemplo, en California, Estados Unidos,

antes de desarrollar estrategias de control para estas enfermedades, debido a la falta de conocimiento de los agentes causales, las pérdidas en el rendimiento mayores al 50% eran muy comunes en los cultivos de nueces (Michailides, 2019). Actualmente una de las estrategias usadas incluye realizar la poda en el mes de noviembre, en lugar de en febrero. Esta estrategia redujo la incidencia de infecciones en California. También se sugiere proteger las heridas rociando fungicidas inmediatamente después de la poda, y el uso de agentes de control biológico, que tiene como ventaja que puede combinarse con otros métodos de control (Michailides, 2019). Aunque es necesaria más investigación sobre métodos de control de enfermedades por especies de Botryosphaeriaceae, por ahora el control químico sigue siendo el más viable para reducir infecciones. Los fungicidas más efectivos usados para proteger los cultivos de nueces son mezclas de estrobilurinas y carboxamidas o de estrobilurinas y dicarboximidas (Michailides et al., 2018).

En México, particularmente en Sonora, se han observado árboles con canchales, y otros síntomas asociados a enfermedades de la madera como la presencia de exudados, conocidos como gomosis, así como muerte regresiva, es decir, árboles que comienzan a morir de la punta hacia la base del tronco. Sin embargo, no se tienen reportes de los organismos responsables de estas enfermedades, y es muy probable que se puedan encontrar varias especies de hongos en las huertas.

1.2 Justificación

México se encuentra en cuarto lugar como productor mundial de nuez y en primer lugar como productor de nuez variedad pecana. El rendimiento de las huertas está siendo afectado por enfermedades que ocasionan deterioro de los árboles, afectando la producción de su fruto. Debido a la importancia económica que representa este cultivo en el país, es necesario identificar a los hongos asociados a las enfermedades, lo que permitirá predecir su daño potencial y establecer un programa para su manejo.

1.1 Hipótesis

En el noroeste de México hay diferentes especies de hongos asociados a enfermedades de la madera de nogal que presentan diferente nivel de virulencia.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Determinar la presencia e identidad de los hongos causantes de enfermedades de madera asociados a nogal en el noroeste de México.

1.1.2 Objetivos específicos

Identificar morfológica y molecularmente aislados fúngicos obtenidos de nogales con síntomas de enfermedades de la madera.

Evaluar y comparar la patogenicidad de los aislados fúngicos seleccionados.

Obtener las temperaturas óptimas de crecimiento para los principales hongos encontrados.

Capítulo 2. Metodología

Se realizó un muestreo en 11 huertas de nogal localizadas en Hermosillo, Sonora (Fig. 1), donde se concentra la producción de nuez en ese estado.

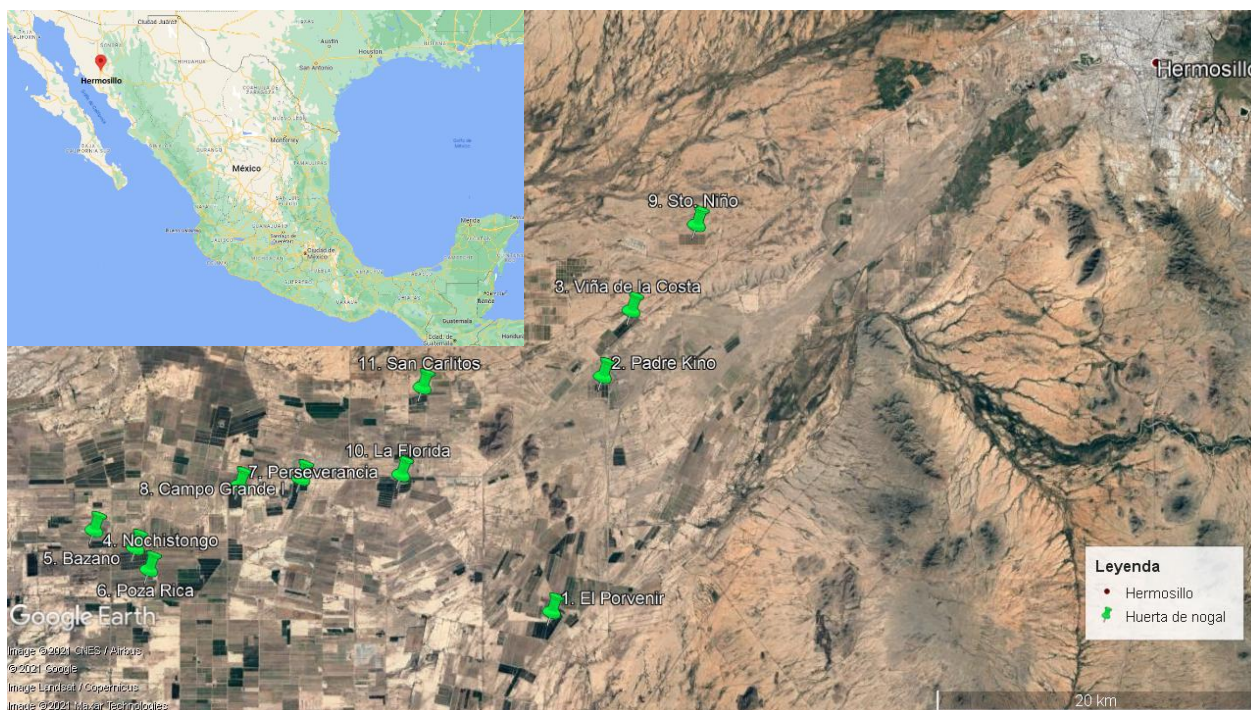


Figura 1. Ubicación de las huertas de muestreo en el municipio de Hermosillo.

Las muestras fueron colectadas por el Ing. Edgardo Urías García, asesor técnico de nogal y por el personal de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Hermosillo. El muestreo estuvo enfocado a plantas que presentaban síntomas de enfermedades de la madera, principalmente con presencia de muerte regresiva y canchales (Fig. 2 y Fig. 3). Se tomaron de 7 a 9 muestras de ramas enfermas de cada sitio. Para realizar el corte, se usaron serruchos de poda para obtener trozos de aproximadamente 15 cm de largo, que se colocaron en bolsas de plástico resellables. Las bolsas se etiquetaron con su lugar de procedencia y número de muestra. Después de cada corte se realizó limpieza al serrucho para evitar fuentes de inóculo. Cada huerta se georreferenció (Tabla 1).

Una vez colectadas, todas las muestras fueron trasladadas inmediatamente por personal de la Junta Local de Sanidad Vegetal de Hermosillo al laboratorio de fitopatología del CICESE en Ensenada, Baja California, manteniéndose en una hielera durante su traslado.

2.1 Análisis de lesiones en maderas de nogal pecanero en laboratorio

Una vez en el laboratorio, las lesiones se analizaron cortando trozos de madera de manera transversal y longitudinal, y tomando fotografías usando una cámara digital Nikon (Fig. 3). Después se observaron bajo un microscopio estereoscópico SZX12 Olympus para buscar micelio y estructuras de reproducción (picnidios, acérvulos, etc.).



Figura 2. Muerte regresiva en árboles de Nogal en el noroeste de México. Se observa el deterioro de la planta de las ramas hacia abajo y la falta de brotación en primavera en las ramas afectadas (Flechas rojas).

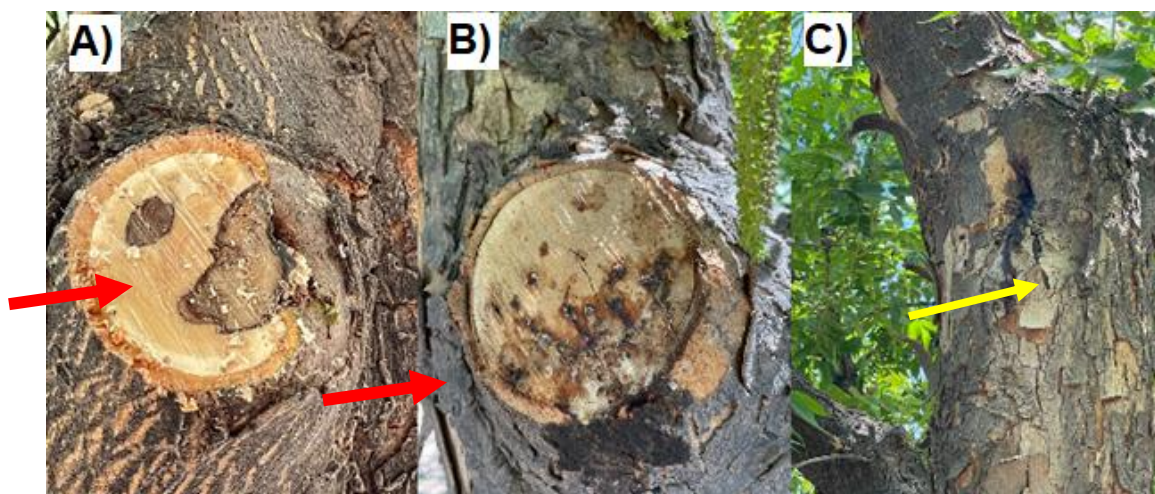


Figura 3. Síntomas observados en la madera de los árboles de nogal en el municipio de Hermosillo. Se observaron canchros o lesiones necróticas (A y B, flecha roja) y en algunos casos la presencia de exudados o gomosis (C, flecha amarilla).

Tabla 1. Lista de huertas de nogal y su ubicación de donde se obtuvieron las muestras analizadas en este estudio.

Número	Huerta	Latitud (°)	Longitud (°)
1	Huerta #1	28.7548700	-111.3491700
2	Huerta #2	28.8878200	-111.3164400
3	Huerta #3	28.9249600	-111.2980500
4	Huerta #4	28.8001500	-111.6450200
5	Huerta #5	28.7901000	-111.6180700
6	Huerta #6	28.7779000	-111.6093800
7	Huerta #7	28.8257100	-111.5509600
8	Huerta #8	28.8297700	-111.5111000
9	Huerta #9	28.9734400	-111.2559400
10	Huerta #10	28.8321300	-111.4464800
11	Huerta #11	28.8814700	-111.4328000

2.2 Aislamiento fúngico y mantenimiento de cepas

El aislamiento de hongos se llevó a cabo removiendo la corteza de la madera. Después se cortaron los tallos en pedazos de aproximadamente 2 cm² y se colocaron en cajas Petri. Cada trozo se esterilizó sumergiendo rápidamente en alcohol y flameando. Cinco trozos superficialmente esterilizados se colocaron de manera equidistantes en cajas Petri de 8 cm de diámetro, con PDA (Agar Papa-Dextrosa) casero suplementado con cloranfenicol a 15 mg/mL. Las cajas Petri se mantuvieron en oscuridad a 28°C, hasta que se pudo apreciar crecimiento del micelio alrededor de la madera. Los cultivos puros se obtuvieron transfirieron micelio de la zona de crecimiento de cada colonia individualmente a cajas Petri de 4 cm con PDA casero. Para el almacenamiento y resguardo a largo plazo, se colocó micelio en tubos de 1.5 mL que contenían 750 µL de PDA. Los hongos se dejaron crecer por 5 días y se transfirieron a 4°C.

2.3 Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica, a partir de cultivos de 3 días de crecimiento, se inoculó un disco micelial de las cepas fúngicas aisladas en medios de PDA y MEA (Agar de Extracto de Malta), se incubaron a 28°C y se observaron periódicamente. A los 7 días de crecimiento o hasta que llenaron la placa se tomaron fotografías con una cámara digital (Nikon Coolpix B600). De los mismos cultivos se cortaron discos de micelio para hacer una observación directa en búsqueda de estructuras de reproducción usando un

microscopio estereoscópico. Las cepas que no produjeron estructuras de reproducción se mantuvieron por un mes en PDA y MEA. Adicionalmente, para estimular la producción de picnidios, se inoculó el hongo con acículas de pino estériles en cajas Petri con 25 mL de agar al 15% en agua. Las cajas inoculadas se mantuvieron durante 5 semanas bajo luz blanca o hasta que se observó la producción de picnidios. De las cajas, se tomaron de 2 a 3 picnidios maduros los cuales se colocaron en un portaobjetos con una gota de KOH al 10%. Se presionó con ayuda de cinta adhesiva y una espátula, para dejar salir las conidiosporas y se observó la preparación en un microscopio invertido Axiovert 200 Zeiss en campo claro y con contraste de fases.

En todos los casos, se tomaron fotografías con un cámara AxioCam HRc, y se procesaron usando el software AxioVision ver. 4.70. Adicionalmente, para comparar las esporas, se midió el largo y ancho de 30 conidiosporas de cada hongo, y se analizaron los parámetros estadísticos medias y desviación estándar y se compararon entre las especies usando el software STATISTICA 8.

2.4 Extracción de ADN y amplificación por PCR de los fragmentos conservados para la identificación molecular de cepas

Para la extracción de ADN, los hongos se inocularon en tubos de 50 mL que contenían 20 mL de medio líquido (PDB, Papa Dextrosa Broth) y se mantuvieron en agitación a 200 rpm por 5 días a 27°C. Después se retiraron de la incubadora y se recuperó el micelio usando un filtro de café estéril. El micelio recuperado se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se almacenó en congelación hasta su uso. Posteriormente el micelio congelado se trituró usando varillas de plástico estériles y un taladro. Para la extracción del ADN genómico se usó el protocolo de CTAB (Wagner et al., 1987) modificado en el laboratorio de fitopatología del CICESE (Rangel-Montoya et al., 2021).

Para caracterizar las cepas se usaron los oligonucleótidos EF1-728F (5'- CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG - 3') y EF1-986R (5'- TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC -3') para amplificar parte del gen de factor-1 α de elongación de traducción (*tef-1 α*) (Carbone and Kohn, 1999). Los oligonucleótidos ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5'- TCCGCTTATTGATATGC -3') se usaron para amplificar la región ITS del ADN nuclear ribosomal, incluyendo el gen 5.8S (White et al., 1990).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Bio-rad T-100 con las siguientes condiciones. Para el *tef-1 α* un ciclo inicial de 95°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s,

55°C por 30 s, y 72°C durante 1 min. Para la región ITS, un ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min, y a 72°C por 1:30 min. Ambos con un ciclo final a 72°C por 10 min. Una vez observados los amplicones resultantes en gel de electroforesis, se procedieron a purificar usando un kit de purificación GeneJet purification kit (Thermo Scientific). Los productos purificados fueron secuenciados por Eton Bioscience Inc.

2.5 Determinación de la temperatura óptima de crecimiento de los aislados seleccionados

La temperatura de crecimiento óptima de las especies seleccionadas se estableció de la siguiente manera. Los aislados seleccionados se inocularon en cajas Petri con medio PDA colocando un disco de micelio de 3mm de diámetro en un extremo de la caja Petri. Se realizaron 3 réplicas por cada cepa y temperatura, y se incubaron a 20, 25, 30, 35, 37 y 40°C. El rango de temperaturas se seleccionó considerando las temperaturas prevalentes de la zona donde fueron obtenidos los aislados. El crecimiento de la colonia fue medido cada 24 h durante 3 días. La temperatura óptima se determinó usando la siguiente ecuación (1)

Ecuación 1. Temperatura optima

$$GR = \frac{Rf - Ri}{Tf - Ti} \quad (1)$$

Donde:

GR= Rango de crecimiento, Rf= radio final, Ri=Radio inicial, Tf= tiempo final, Ti= tiempo inicial (día 1).

2.6 Análisis filogenético de cepas seleccionada de nogal pecanero

Para el análisis filogenético, las secuencias tanto del *tef-1* α y la región ITS se analizaron usando BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999) y MEGA X (Kumar et al., 2018). Posteriormente, se realizó un análisis BLAST y las secuencias con mayor similitud se descargaron de la base de datos del GenBank del NCBI (The National Center for Biotechnology Information) Con las secuencias obtenidas del NCBI y las secuenciadas de los hongos identificados en este estudio, se realizó un alineamiento múltiple por cada grupo morfogenético identificado usando ClustalW con los parámetros por defecto (Thompson et al., 1994). Cada alineamiento

se corrigió manualmente y se obtuvo un alineamiento concatenado de la región ITS y *tef-1* α usando el programa BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999). A partir del alineamiento concatenado, se realizó un análisis de Maximum Likelihood (ML) utilizando MEGA-X con valores de Bootstraps de 1000 repeticiones. Los árboles se visualizaron en MX: Tree Explorer.

2.7 Pruebas de patogenicidad de cepas fúngicas obtenidas de nogal pecanero

Para las pruebas de patogenicidad se seleccionaron dos cepas de cada especie identificada molecularmente. Se crecieron en cajas Petri con medio PDA y se incubaron durante 3 días. Para la inoculación se usaron discos de micelio de 3 mm de diámetro y árboles de nogal de aproximadamente 3 años. La inoculación se hizo en el tallo, para ello se realizó una herida usando un taladro, limpiando la broca con alcohol al 70% antes y después de cada perforación. Dentro de la herida se colocó el disco de micelio y se selló con parafilm para evitar la deshidratación del disco. De cada cepa se hicieron siete réplicas y como control negativo se usó un disco de medio PDA estéril siguiendo el mismo procedimiento. Las plantas se regaron cada tercer día y se mantuvieron durante dos meses en condiciones de invernadero.

Para el análisis de las lesiones, los tallos se cortaron 10 cm hacia arriba y hacia abajo de la lesión, se retiró el parafilm y se realizó un corte longitudinal para observar y medir la lesión causada por cada una de las cepas inoculadas.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Muestreo

Los árboles de los cuales se recolectaron las muestras presentaban síntomas de muerte regresiva canchros o lesiones necróticas, pudriciones y en algunos casos exudados gomosos (Fig. 4). En total se obtuvieron 70 trozos de madera de las once huertas muestreadas. De esas muestras se aislaron 110 cepas. Cada cepa se nombró de acuerdo con el sitio de coleta (M1 a M11), el número de tallo del que fue obtenido (T1 a T7) y la muestra obtenida de cada tallo (A - D).

Para la caracterización de los aislados, las cepas se agruparon por sitio y por muestra para seleccionar solamente los morfotipos que no se repetían en cada sitio para su posterior caracterización.

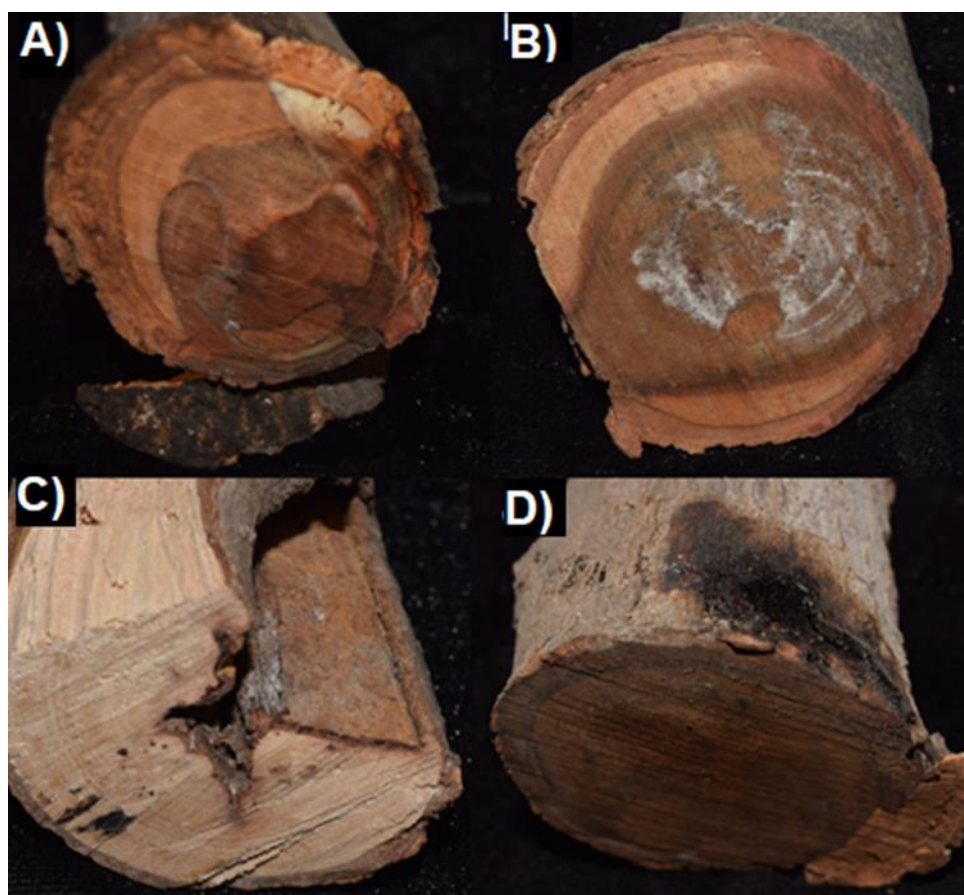


Figura 4. Lesiones y síntomas en la madera observados durante el procesamiento de muestra. Se observa la presencia de canchros y necrosis en el tejido del tronco (A-C) y la presencia de exudados (D).

3.2 Características de aislados fúngicos identificados en este estudio

De las 50 cepas seleccionadas, se encontraron ocho morfotipos (Fig. 5). Por sus características morfológicas y moleculares se identificaron los géneros de hongos de madera: *Pseudofusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Diaporthe* y *Eutypella*. Adicionalmente se encontraron otros géneros como *Fusarium*, *Chaetomium*, *Epicoccum* y *Cladosporium*. La tabla 2 resume los géneros putativos presentes de acuerdo con su morfología de colonia y el tipo de conidios observados. A continuación, se resumen las características de las especies encontradas.

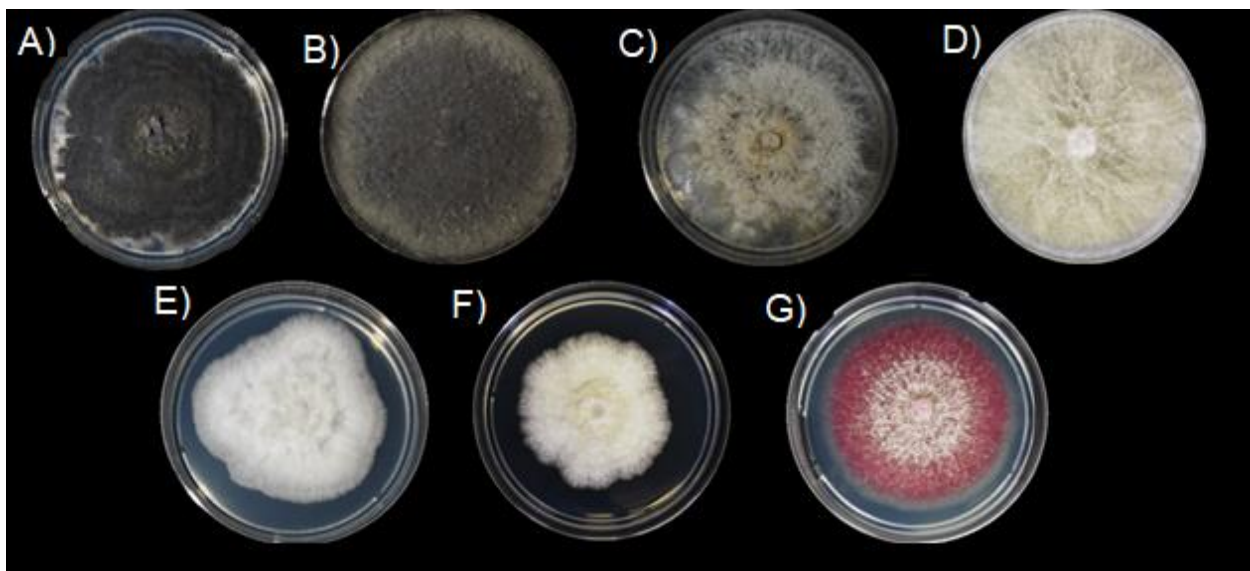


Figura 5. Morfotipos observados en las cepas seleccionadas. A) *Pseudofusicoccum*. B) *Lasiodiplodia*. C) *Diaporthe*. D) *Eutypella*. E-G) *Fusarium*.

3.2.1 *Pseudofusicoccum stromaticum*

De acuerdo con las características morfológicas, el primer morfotipo identificado incluyó 15 de las cepas seleccionadas (M1T2B, M4T5B, M7T8A, M8T3A, M9T4 y M10T4, entre otras), cuyas características los agrupan dentro del género *Pseudofusicoccum* (Fig. 6). Las cepas se caracterizaron por presentar un pigmento violeta en los primeros días de crecimiento al observar el reverso de la caja Petri y presentar abundante micelio aéreo. Con el paso de los días el pigmento desaparece y la colonia se torna grisácea. La aparición de picnidios se observó después de 5 semanas de la inoculación en agar agua, aunque no todos estaban maduros. Se observaron picnidios de diferentes formas y solos o en grupos, de color negro y en forma de botella. Este género se encontró en diez sitios de los once muestreados.

Tabla 2. Lista de las cepas seleccionadas de las huertas en este estudio

Huerta	Cepa	Género putativo
Huerta #1	M1T1B	<i>Diaporthe</i>
	M1T2A	<i>Pseudofusicoccum</i>
	M1T2B	<i>Pseudofusicoccum</i>
Huerta #2	M2T2	<i>Lasiodiplodia</i>
Huerta #3	M3T1B	<i>Diaporthe</i>
	M3T3A	<i>Pseudofusicoccum</i>
Huerta #4	M4T2A	<i>Lasiodiplodia</i>
	M4T2B	<i>Eutypella</i>
	M4T5A	<i>Diaporthe</i>
	M4T5B	<i>Pseudofusicoccum</i>
Huerta #5	M5T3	<i>Lasiodiplodia</i>
	M5T5A	<i>Eutypella</i>
Huerta #6	M6T2A	<i>Diaporthe</i>
	M6T4B	<i>Fusarium</i>
	M6T4C	<i>Pseudofusicoccum</i>
Huerta #7	M7T1A	<i>Pseudofusicoccum</i>
	M7T2A	<i>Diaporthe</i>
	M7T4A	<i>Pseudofusicoccum</i>
	M7T7	<i>Fusarium</i>
	M7T8A	<i>Pseudofusicoccum</i>
Huerta #8	M8T3A	<i>Pseudofusicoccum</i>
	M8T4A	<i>Pseudofusicoccum</i>
	M8T5A	<i>Pseudofusicoccum</i>
Huerta #9	M9T1B	<i>Diaporthe</i>
	M9T1E	<i>Fusarium</i>
	M9T4	<i>Pseudofusicoccum</i>
Huerta #10	M10T3A	<i>Pseudofusicoccum</i>
	M10T3B	<i>Fusarium</i>
	M10T3C	<i>Fusarium</i>
	M10T4	<i>Pseudofusicoccum</i>

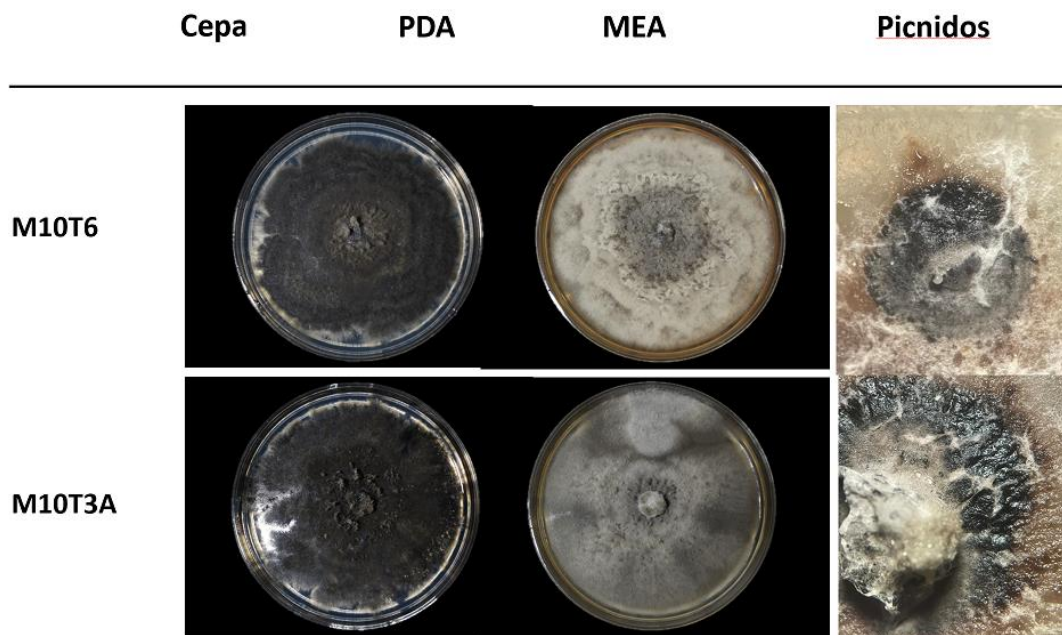


Figura 6. Características de las colonias de *P. stromaticum*.

Las conidiósporas observadas son hialinas, de paredes delgadas a ligeramente engrosadas, con septos apenas visibles, con contenido granular, baciliformes, rectos a ligeramente curvados, ápice y base redondeados (Fig. 7). La medida de las esporas en promedio fue de $21.92 \mu\text{m} \pm 1.59 \times 4.20 \pm 0.40 \mu\text{m}$ (Tabla 3).

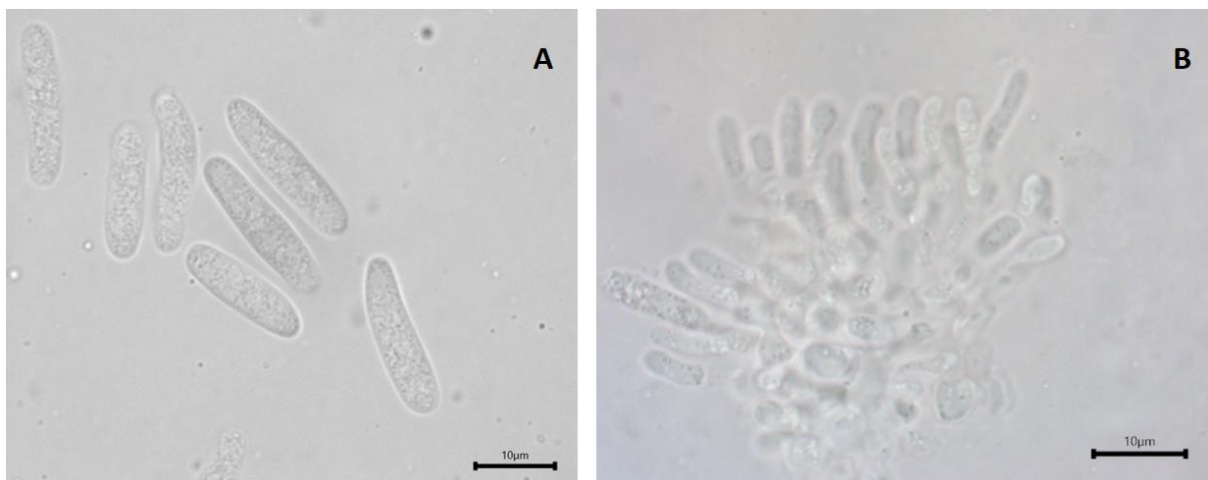


Figura 7. Morfología de conidios de conidios y células conidiógenas de *P. stromaticum* aislado de huertas de nogal en Sonora. A. Conidios hialinos baciliformes sin septo de *P. stromaticum*. B. Células conidiógenas de la cepa M10T2A (B).

Tabla 3. Dimensiones de las conidiósporas de cepas de *Pseudofusicoccum stromaticum* identificadas en este estudio.

Cepa	Origen	Talla de conidios (μm)*	Media (μm) \pm Desviación estándar
M1T2B	Huerta #1	27.9 - 18.7 (22.8) x 4.5 x 2.7 (3.6)	22.7 \pm 2.2 x 3.6 \pm 0.3
M5T6B	Huerta #5	26.5 - 17.3 (22.6) x 5 - 2.6 (3.8)	22.5 \pm 2.2 x 3.7 \pm 0.4
M5T7		23.1 - 18.5 (20) x 5 - 3.4 (4.2)	20.8 \pm 1.1 x 4.2 \pm 0.3
M6T4C	Huerta #6	22.4 - 17.6 (20) x 5 - 3.7 (4.3)	19.9 \pm 0.9 x 4.3 \pm 0.3
M7T1A	Huerta #7	27.8 - 19.8 (22.6) x 5 - 3.6 (4.3)	22.5 \pm 1.7 x 4.3 \pm 0.3
M7T4		22.3 - 16.8 (19.4) x 4.7 - 2.7 (3.9)	19.4 \pm 1.7 x 3.9 \pm 0.4
M7T8A		20.2 - 15 (17) x 4.4 - 2.9 (3.8)	17.4 \pm 1.2 x 3.7 \pm 0.3
M8T4A	Huerta #8	25.2 - 18.8 (20) x 4 - 2.5 (3.3)	20.7 \pm 1.5 x 3.2 \pm 0.3
M8T5A		27.4 - 15 (22) x 4.5 - 2.9 (3.8)	21.7 \pm 3.1 x 3.8 \pm 0.4
M9T4	Huerta #9	24.9 - 18.8 (22) x 5.3 - 3.8 (4.3)	21.9 \pm 1.6 x 4.3 \pm 0.3
M10T3A	Huerta #10	26.5 - 18.5 (22) x 3.8 - 2.5 (3.2)	21.9 \pm 2 x 3.1 \pm 0.3
M10T4		25.6 - 16.7 (21.1) x 4.3 - 2.6 (3.3)	21 \pm 1.9 x 3.34 \pm 0.4
M10T6		25.2 - 18.1 (21.9) x 4.9 - 3.2 (4.2)	22 \pm 1.6 x 4.20 \pm 0.4

*Talla mayor, menor, (promedio), promedio de longitud y altura de 30 conidios.

Tabla 4. Lista de números de acceso GeneBank de *Pseudofusicoccum* spp. usados en este estudio para análisis filogenético.

Especie	Cepa	Huésped	Origen	Número de acceso GeneBank	
				ITS	tef-1 α
<i>P. adansoniae</i>	CBS 122053	<i>Acacia synchronica</i>	Australia	EF585525	EF585569
<i>P. africanum</i>	CMW48035	<i>Mimusops caifra</i>	Sudáfrica	MH270506	MH576590
<i>P. africanum</i>	CMW 48030	<i>Mimusops caifra</i>	Sudáfrica	MH558618	MH576593
<i>P. artocarp</i>	B0431	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Tailandia	KM006452	KM006483
<i>P. kimberleyense</i>	CBS122060	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	EU144058	EU144073
<i>P. kimberleyense</i>	CBS122061	<i>Ficus opposita</i>	Australia	EU144059	EU144074
<i>P. stromaticum</i>	CBS 138362	<i>Eucalyptus urophylla</i> , ramas	América del sur	KP872348	KP872378
<i>P. violaceum</i>	CBS 115453	<i>Microcos paniculatus</i>	China	MT587548	MT592283
<i>P. violaceum</i>	CBS 115594	<i>Microcos paniculatu</i> , fruta	China	MT587549	MT592284
<i>P. adansoniae</i>	CBS 122054	<i>Eucalyptus sp.</i>	Australia	EF585532	EF585570
<i>P. ardesiacum</i>	CBS122062	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	EU144060	EU144075
<i>P. ardesiacum</i>	CBS122063	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	EU144061	EU144076
<i>P. calophylli</i>	C346	<i>Calophyllum inophyllum</i>	Tailandia	MK347764	MK340877
<i>P. olivaceum</i>	CMW20881	<i>Pterocarpus angolensis</i>	Sudáfrica	FJ888459	FJ888437
<i>P. olivaceum</i>	CMW22637	<i>Pterocarpus angolensis</i>	Sudáfrica	FJ888462	FJ888438

En el análisis en la base de datos del NCBI usando BLAST, las cepas mostraban 97% de similitud con *Pseudofusicoccum adansoniae* en su ITS y *P. violaceum* y *P. calophylli* con *tef-1 α* . El análisis filogenético con cepas del género *Pseudofusicoccum* obtenidas en este estudio y las recuperadas de la base de datos

de NCBI (Tabla 4) mostró que las 15 cepas identificadas en este estudio se agrupan con la especie *Pseudofusicoccum stromaticum* (Fig. 8).

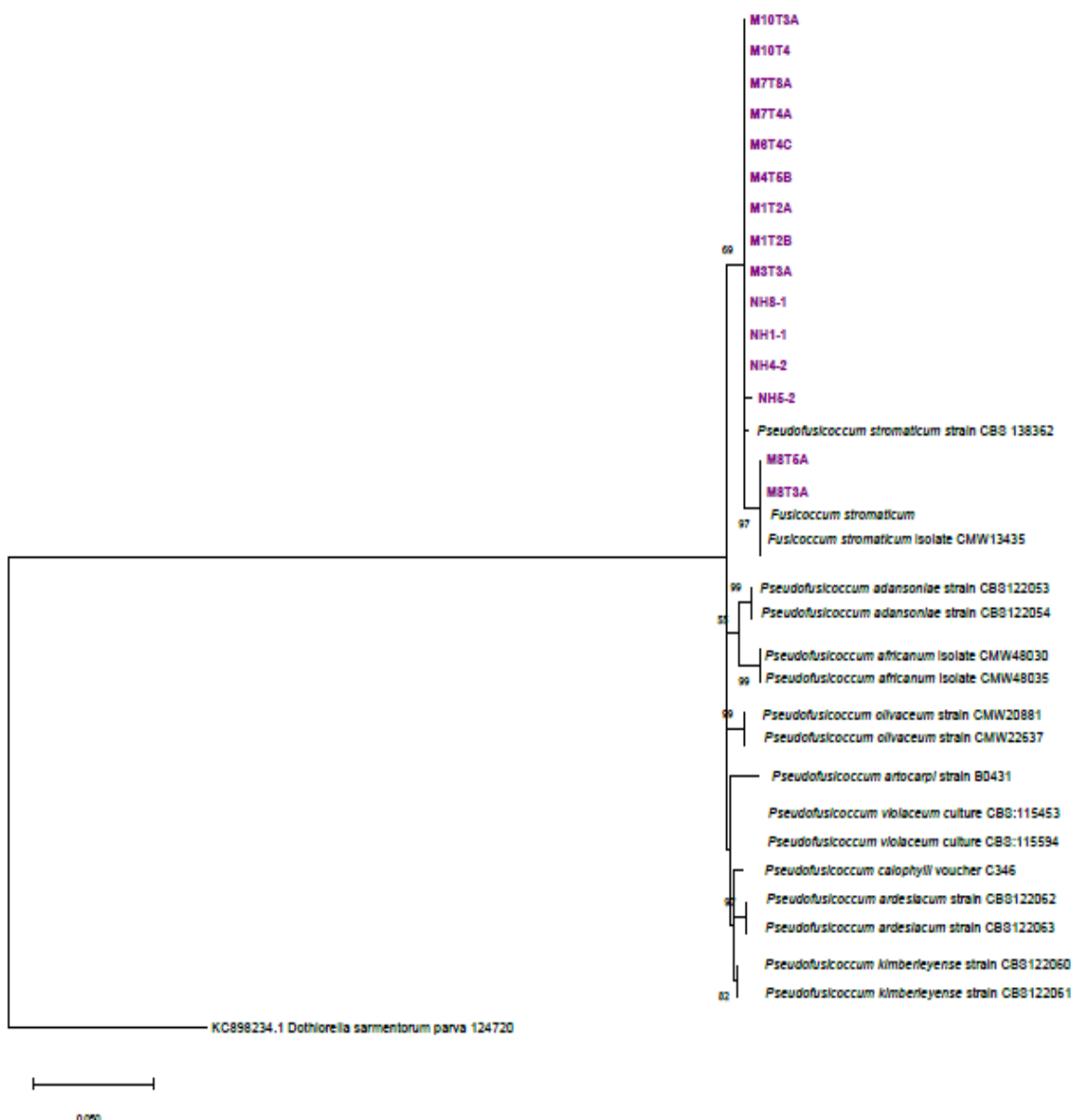


Figura 8. Análisis filogenético de las cepas de *Pseudofusicoccum*. La construcción del árbol se hizo usando el método Maximum Likelihood obtenido a partir de las secuencias concatenadas de las regiones ITS y tef-1 α de las cepas analizadas en este estudio y de cepas del género *Pseudofusicoccum* obtenidas de NCBI. Los valores de bootstraps fueron 1000 réplicas, el árbol se enraizó con *Dothiorella sarmentorum parva* (124720), los aislados obtenidos en este estudio están marcados en morado.

3.2.2 *Lasiodiplodia* spp.

El segundo morfotipo incluyó a los aislados M2T2, M3T5, M4T2A, M5T3A, M8T4B que se identificaron como pertenecientes al género *Lasiodiplodia*. Estas especies se caracterizan por presentar micelio aéreo

blanquecino que se torna grisáceo primero y posteriormente negro (Fig. 9). *Lasiodiplodia* se encontró en cinco sitios de muestreo.

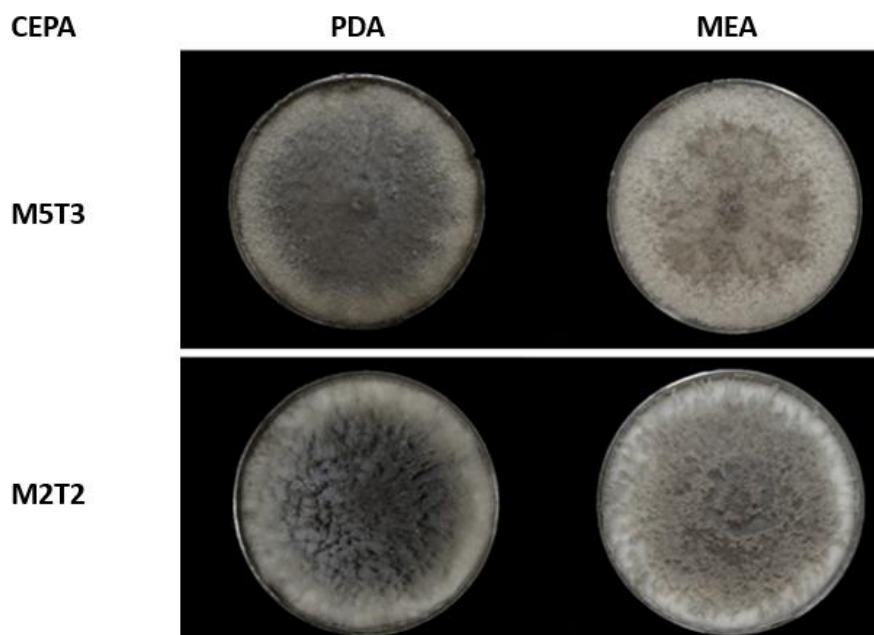


Figura 9. Características de las colonias de *L. brasiliense* (M5T3) y *L. exigua* (M2T2).

Las conidiósporas son ovaladas, inicialmente hialinas y aseptadas, y posteriormente se tornaron color marrón oscuro, septadas o con estrías irregulares (Fig. 10). La media de la cepa que presentó conidios más grandes fue $23.9 \pm 2.1 \mu\text{m} \times 12.87 \pm 0.9 \mu\text{m}$ (Tabla 5). El análisis molecular identificó a las especies *L. brasilienses* y *L. exigua* (Fig. 11), pero muy probablemente existe una tercera especie por las medidas de las conidiósporas de las cepas M3T5, M4T2A y M8T4B (Tabla 5) pero no pudo ser identificada por problemas con la calidad de las secuencias obtenidas.



Figura 10. Características del género *Lasiodiplodia*, conidios ovalados, pigmento marrón oscuro y con septo.

Tabla 5. Dimensiones de conidiósporas de cepas pertenecientes a *Lasiodiplodia* spp. en este estudio.

Cepa	Origen	Talla de conidios (μm)*	Media (μm) \pm Desviación estándar
<i>Lasiodiplodia exigua</i> .			
M2T2	Huerta #2	22.3 - 15.4 (19.5) x 14.1 - 9 (11.4)	19.5 \pm 1.5 x 11.4 \pm 1.1
<i>Lasiodiplodia brasiliensis</i> .			
M5T3	Huerta #5	22.6 - 18.5 (20.3) x 12.5 -9.7 (11.2)	20.3 \pm 1 x 11.2 \pm 0.7
<i>Lasiodiplodia</i> spp.			
M3T5	Huerta #3	29.5 - 20.4 (24) x 15 - 11 (12.9)	23.9 \pm 2.1 x 12.8 \pm 0.94
M4T2A	Huerta #4	26.3 - 19.3 (22.8) x 14.7 - 9.6 (12.2)	22.7 \pm 1.7 x 12.2 \pm 1.01
M8T4B	Huerta #8	25.5 - 20.1 (22.9) x 13.71 - 10 (11.7)	22.8 \pm 1.6 x 11.7 \pm 0.84

*Talla mayor, menor, promedio (longitud y altura de 30 conidios)

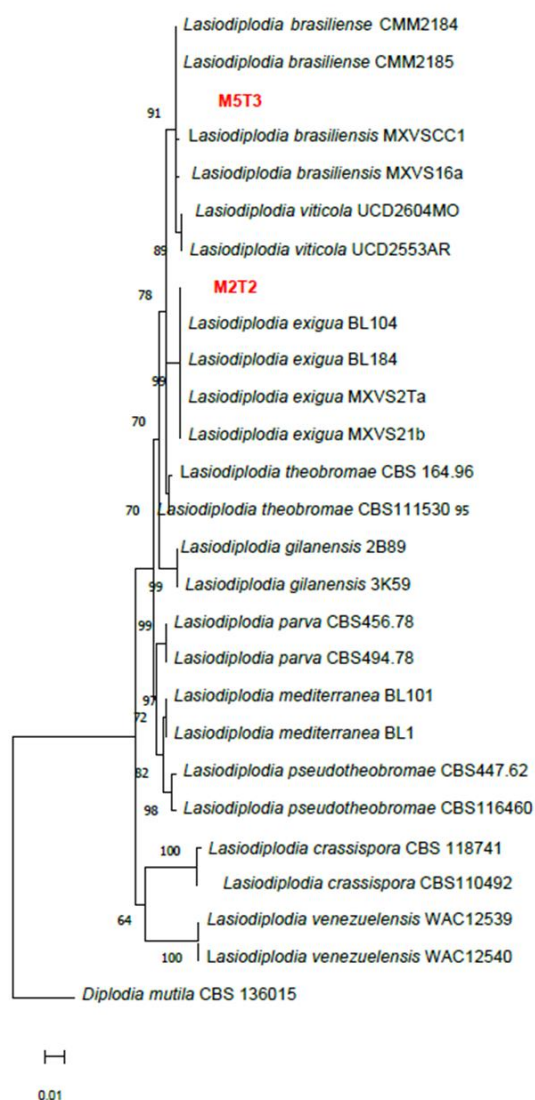


Figure 11. Análisis filogenético de cepas del género *Lasiodiplodia*. Para la construcción del árbol se usó el método Maximum Likelihood obtenido a partir de las secuencias concatenadas de las regiones ITS y tef-1 α de las cepas analizadas en este estudio y de cepas del género *Lasiodiplodia* obtenidas de NCBI. Los valores de bootstraps fueron 1000 réplicas, el árbol se enraizó con *Diploia mutila* (CBS 136015), los aislados obtenidos en este estudio están marcados en rojo.

3.2.3 *Diaporthe caatingaensis*

Se identificaron seis aislados pertenecientes al género *Diaporthe* (M1T1B, M3T1B, M4T5A, M6T2A, M7T2A y M9T1B). Éstos presentaron crecimiento con bordes irregulares y micelio blanquecino al principio, con tonalidades naranjas con el paso del tiempo y la formación de picnidios ostiolados con fiáldes cilíndricas (Fig. 12), dentro de los cuales se encontraron α -conidios, los cuales son hialinos, elipsoides, y de menor tamaño, y β -conidios, los cuales son hialinos, filiformes y más largos que los alfa (Fig. 13) (Ortega et al, 2015).

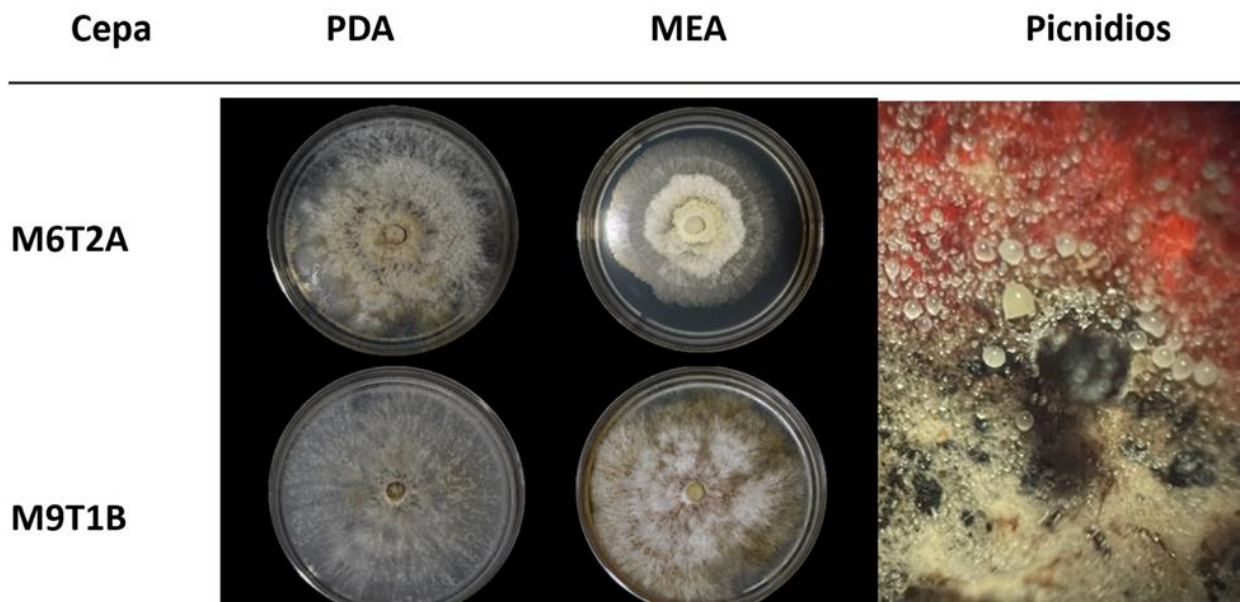


Figura 12. Características de las colonias de *Diaporthe caatingaensis*.

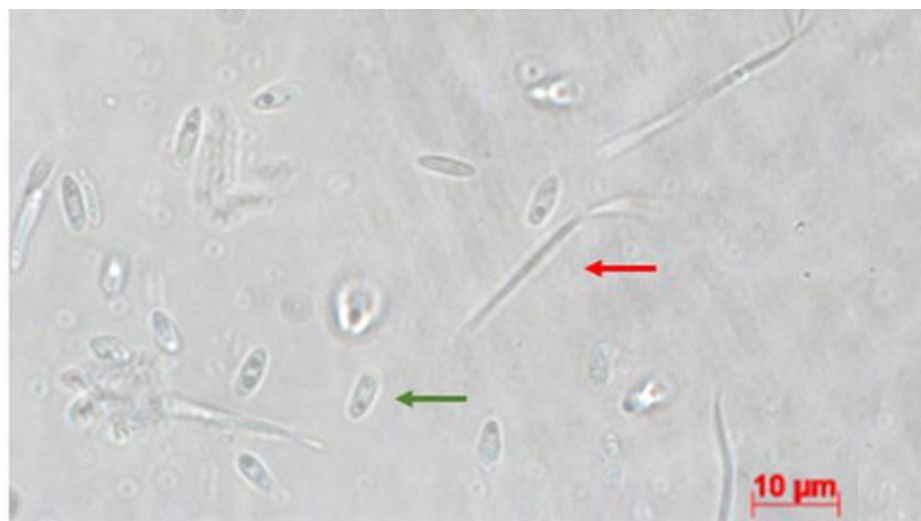


Figura 13. Morfología de conidios de *Diaporthe caatingaensis*. Se observan α -conidios (flecha verde) y β -conidios (flecha roja).

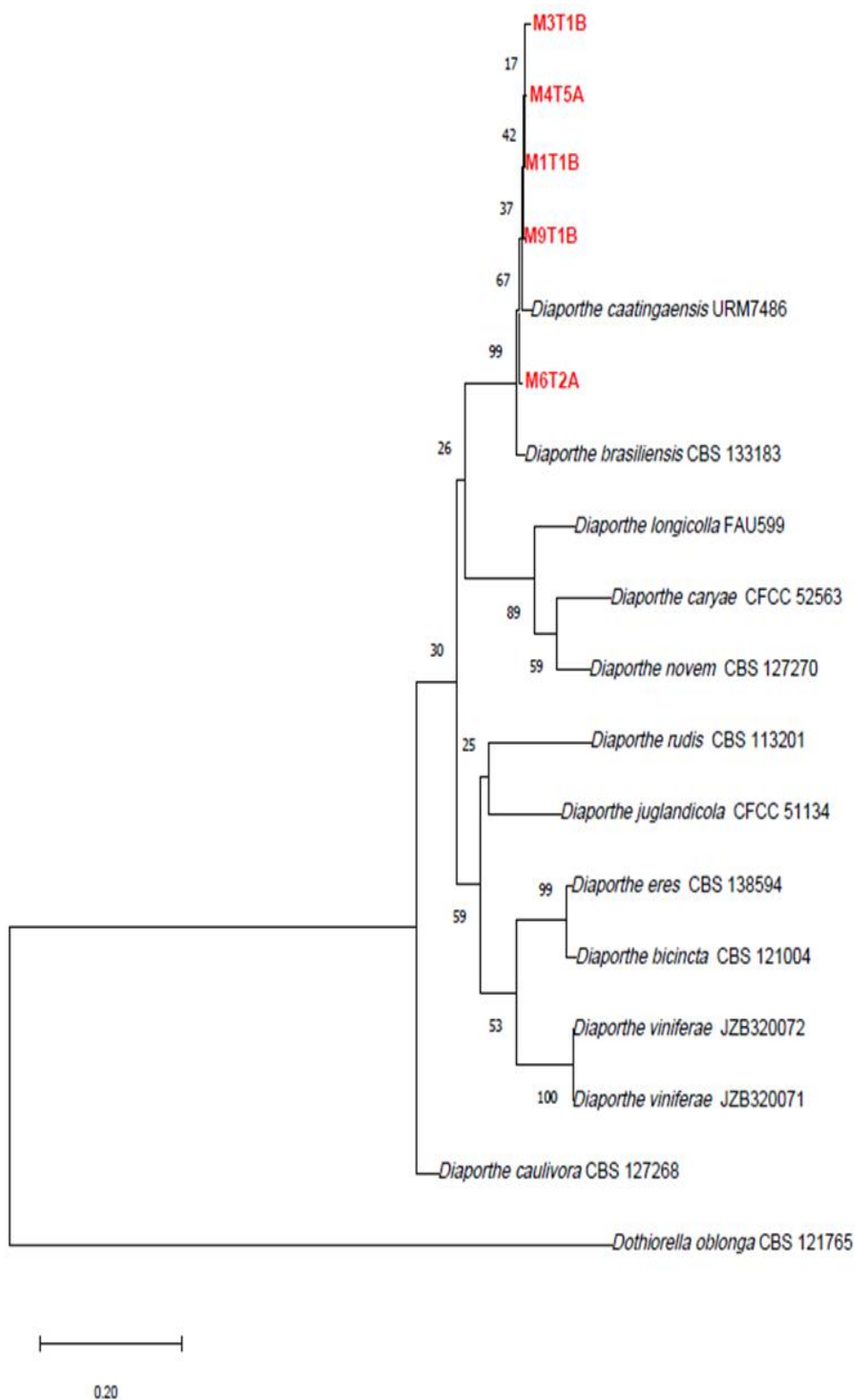


Figura 14. Análisis filogenético de las cepas del género *Diaporthe*. Para la construcción del árbol se usó el método Maximum Likelihood obtenido a partir de las secuencias concatenadas de las regiones ITS y *tef-1 α* de las cepas del género *Diaporthe* sp. analizadas en este estudio y de cepas del mismo género obtenidas de NCBI. Los valores de bootstrap fueron de 1000 réplicas. El árbol se enraizó con *Dothiorella oblonga* (CBS 2—1765). Los aislados obtenidos en este estudio están marcados en rojo.

Tabla 6. Lista de números de acceso GeneBank de *Diaporthe* sp. usados en este estudio para el análisis filogenético

Especie	Cepa	Huésped	Origen	Número de acceso GeneBank	
				ITS	tef-1 α
<i>D. caatingaensis</i>	URM7486	<i>Tacinga inamoena</i>	Brasil	KY085927	KY115603
<i>D. brasiliensis</i>	CBS 133183	<i>Aspidosperma tomentosum</i>	Brasil	NR_111844	KC343768
<i>P. longicolla</i>	FAU599	<i>Glycine max</i>	USA	NR_144924	KJ590767
<i>D. caryae</i>	CFCC 52563	<i>Carya illinoensis</i>	China	NR_165875	MH121540
<i>D. novem</i>	CBS 127270	<i>Glycine max</i>	Croacia	NR_111855	KC343882
<i>D. rudis</i>	CBS 113201	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	KC343234	KC343960
<i>D. juglandicola</i>	CFCC 51134	<i>Juglans mandshurica</i>	China	KU985101	KX024628
<i>D. eres</i>	CBS 138594	<i>Ulmus sp.</i>	Alemania	NR_144923	KJ210550
<i>D. bicincta</i>	CBS 121004	<i>Junglans sp.</i>	USA	NR_147526	KC343860
<i>D. viniferae</i>	JZB320072	<i>Vitis vinifera</i>	China	MK341551	MK500108
<i>D. viniferae</i>	JZB320071	<i>Vitis vinifera</i>	China	MK341550	MK500107
<i>D. caulivora</i>	CBS 127268	<i>Glycine max</i>	Croacia	NR_111845	KC343771
<i>Dothiorella oblonga</i>	CBS 121765	<i>Acacia mellifera</i>	Sudáfrica	NR_137689	EU101345

De acuerdo con el análisis filogenético concatenado de las regiones ITS y tef-1 α de las cepas del género *Diaporthe*, recuperadas de la base de datos de NCBI (Tabla 6) y las cepas aisladas en este estudio (M1T1B, M3TB, M4T5A, M6T2A Y M9T1B) se agruparon con la especie *Diaporthe caatingaensis* (Fig. 14), lo cual coincidió con los resultados obtenidos al analizar las secuencias en BLAST de NCBI. Esta especie se encontró presente en siete huertas.

3.2.4 *Eutypella microtheca*

Un morfotipo que se encontró en menor abundancia fue el que incluye a las cepas M4T2B y M5T5A, las cuales presentaron micelio abundante y blanquecino que con el paso del tiempo se tornó anaranjado claro, en el cual no se observó la formación de esporas (Fig. 15).

De acuerdo con los resultados obtenidos de la región ITS analizados en BLAST de NCBI las cepas mostraron mayor similitud con la especie *Eutypella vitis*. El análisis filogenético generado con cepas pertenecientes al género *Eutypella* obtenidas en este estudio y las recuperadas de la base de datos de NCBI (Tabla 7), se encontró que ambas cepas se agrupan con la especie *Eutypella microtheca* (Fig. 16)

PDA

MEA

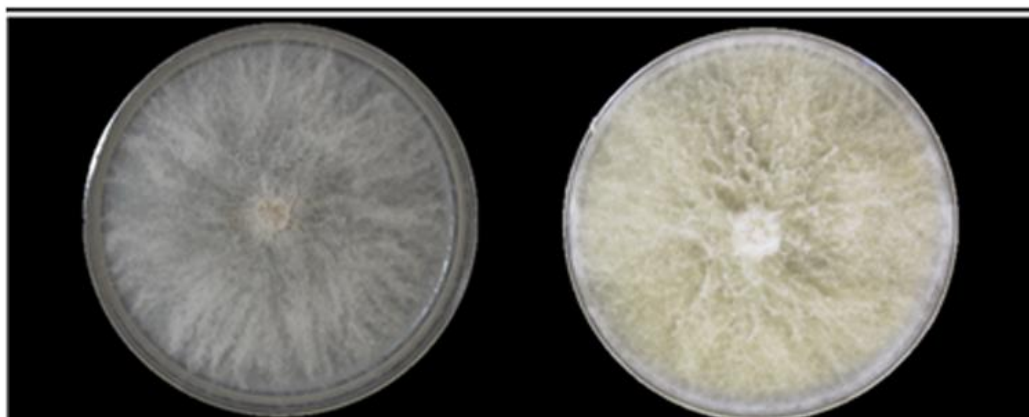


Figura 15. Características de las colonias de *Eutypella microtheca*, cepa M4T2B.

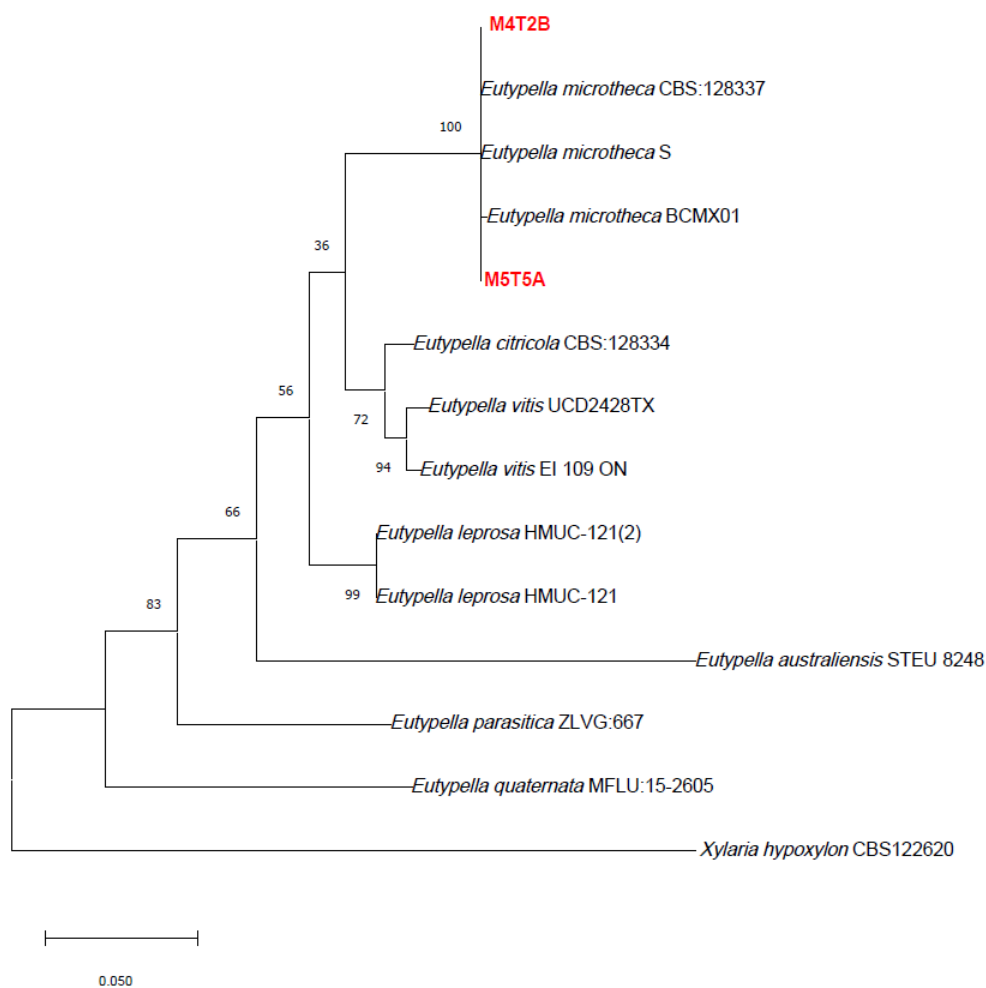


Figura 16. Análisis filogenético de cepas de *Eutypella*. El árbol se contruyó usando el método Maximum Likelihood obtenido a partir de las secuencias de la región ITS de las cepas del género *Eutypella* sp. analizadas en este estudio y de cepas del mismo género obtenidas de NCBI. Los valores de bootstrap fueron de 1000 réplicas. El árbol se enraizó con *Xylario hypoxylon* (CBS 122620). Los aislados obtenidos en este estudio están marcados en rojo.

Tabla 7. Lista de números de acceso GeneBank de *Eutypella* sp. usados en este estudio para análisis filogenético.

Especie	Cepa	Huésped	Origen	Número de acceso
				GeneBank ITS
<i>Eutypella citricola</i>	CBS 128334	-	Australia	MH864885.1
<i>Eutypella microtheca</i>	BCMX01	<i>Vitis vinifera</i>	México	KC405563.1
<i>Eutypella microtheca</i>	CBS:128337	-	Australia	MH864886.1
<i>Eutypella microtheca</i>	S	<i>Oryza sativa</i>	Kenia	OM899919.1
<i>Eutypella vitis</i>	UCD2428TX	<i>Vitis vinifera</i>	USA	FJ790851.1
<i>Eutypella vitis</i>	EI 109 ON	<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	Canadá	MW145154.1
<i>Eutypella leprosa</i>	HMUC-121	-	Chile	HQ694975
<i>Eutypella australiensis</i>	STEU 8248	-	Sudáfrica	MF359657
<i>Eutypella parasitica</i>	ZLVG:667	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Italia	KY312115
<i>Eutypella quaternata</i>	MFLU:15-2605	<i>Salix udensis</i>	Italia	MT185553
<i>Xylaria hypoxylon</i>	CBS122620	-	Suecia	KY204024

3.2.5 *Fusarium* spp.

Dentro de los otros morfotipos observados se identificaron tres especies de *Fusarium* que incluyen las cepas M7T7, M10T3B y M9T1E, que pertenecen a *F. incarnatum*. M6T4B que pertenece a *F. lacertarum* y M10T3C pertenece a *F. decemcellulare* (Fig. 17). Estas especies se encontraron en cinco sitios de muestreo. *F. decemcellulare* presentó un crecimiento irregular y pigmentación rosa y pigmento amarillo oscuro en el centro (Fig. 17, A).

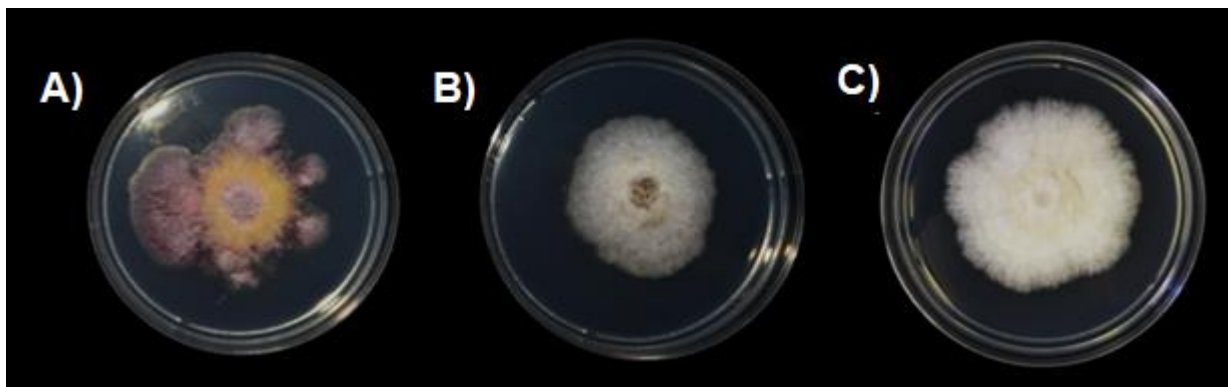


Figura 16. Crecimiento en medio PDA de *Fusarium* spp. (A) *Fusarium decemcellulare*, (B) *Fusarium incarnatum* y (C) *Fusarium lacertarum*.

La cepa del grupo de *Fusarium* sp. presentó conidios largos y hialinos, ligeramente curvados. Las medidas fueron $26.68 \mu\text{m} \pm 3.42 \times 3.62 \mu\text{m} \pm 0.44$ y para M6T3C fueron $22.18 \mu\text{m} \pm 4.24 \times 3.04 \mu\text{m} \pm 0.48$. Las características de este grupo coinciden con el género *Fusarium*.

El análisis de las regiones ITS y tef-1 α de las cepas pertenecientes al género *Fusarium* en la base de datos BLAST de NCBI mostraron coincidencia con 5 especies diferentes del género *Fusarium* (Tabla 8). Al realizar el análisis filogenético concatenado de ambas regiones (Fig. 18), se encontró que las cepas M7T7 y M10T3B se agruparon con la especie *F. incarnatum*, lo cual coincide con las características morfológicas de estas dos cepas. La cepa M10T3B mostró un crecimiento más rápido que la otra cepa. La cepa M6T4B presentaba similitud a las cepas *F. incarnatum*.

En el análisis de las regiones en BLAST mostraban coincidencia con *F. chlamyosporum* y *F. lacertarum*, pero en el análisis filogenético se agrupó con la especie *F. lacertarum*. La última cepa analizada de este género fue la M10T3C la cual mostró diferencias morfológicas al resto de las especies de este género aisladas en este estudio. Fue la única cepa que mostró un micelio con diferente pigmentación a la blanquecina del resto. Esta cepa se agrupó con la especie *F. decemcellulare*, y solo se encontró en dos huertas de nogal, mientras que el resto de las especies se encontraron en ocho huertas.

Tabla 8. Lista de números de acceso GeneBank de *Fusarium* spp. usados en este estudio para análisis filogenético

Especie	Aislado	Huésped	Origen	Número de acceso GeneBank	
				ITS	tef-1a
<i>F. domesticum</i>	CBS 102407		Slovenia	EU926221.1	EU926288.1
<i>F. equiseti</i>	NRRL 20697	-	USA	GQ505683.1	GQ505594.1
<i>F. arcuatisporum</i>	LC12147	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>oleifera</i>	China	MK280802.1	MK289584.1
<i>F. arcuatisporum</i>	LC11639	<i>Oryza</i> sp.	China	MK280840.1	MK289586.1
<i>F. avenaceum</i>	1	Patata	China	KF939132.1	FJ154734.1
<i>F. cf. solani</i>	PUF007	-	China	HQ165910.1	HQ165838.1
<i>F. chlamyosporum</i>	CBS 145.25	<i>Musa sapientum</i>	Honduras	NR_172283.1	MN120754.1
<i>F. chlamyosporum</i>	F-2	Plátano	China	KY211035.1	KY211036.1
<i>F. decemcellulare</i>	13657	<i>Podocarpus macrophyllus</i>	Japan	KJ648615.1	KJ648617.1
<i>F. duplospermum</i>	NRRL 62583	-	USA	KC691581.1	KC691553.1
<i>F. equiseti</i>	NRRL 20697	-	USA	GQ505683.1	GQ505594.1
<i>F. equiseti</i>	XJ-QT-F18-11	Remolacha		KT224269.1	KT224322.1
<i>F. incarnatum</i>	MKUZF1	Pimiento	Turquia	OP006283.1	MT299557.1
<i>F. incarnatum</i>	NRRL 32867	-	USA	GQ505705.1	GQ505616.1
<i>F. lacertarum</i>	LC7927	<i>Capsicum</i> sp.	China	MK280838.1	MK289637.1
<i>F. lacertarum</i>	CAS	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Brasil	KP727645.1	KM679358.1
<i>F. martii</i>	CBS 115659	-	USA	MH582405.1	MH582425.1

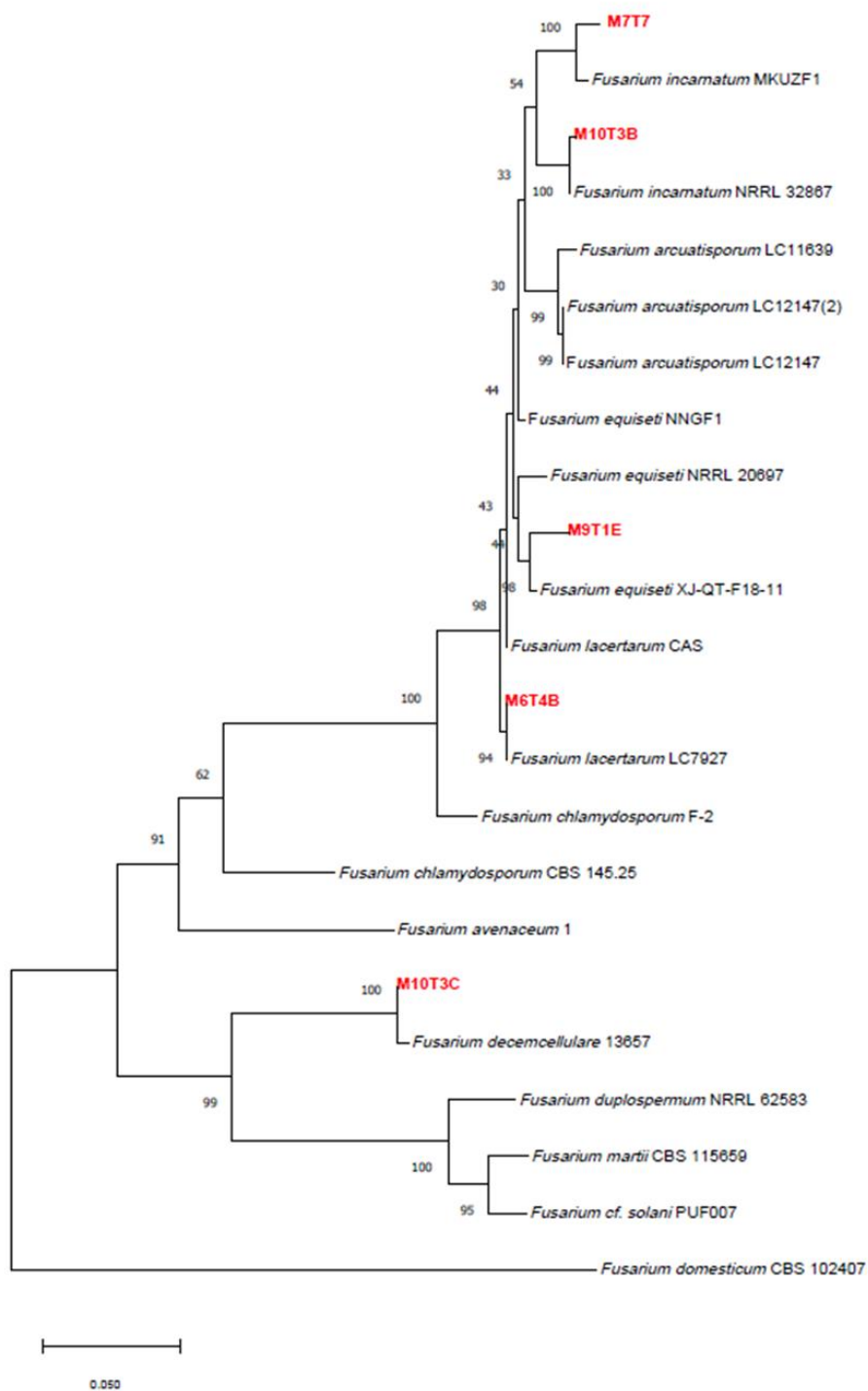


Figura 17. Análisis filogenético de cepas del género *Fusarium*. El árbol se construyó usando el método Maximum Likelihood obtenido a partir de las secuencias concatenadas de las regiones ITS y *tef-1 α* de las cepas analizadas en este estudio y de cepas del género *Fusarium* sp. obtenidas de NCBI. Los valores de bootstrap fueron de 1000 réplicas. El árbol se enraizó con *Fusarium domesticum* (CBS 102407). Los aislados obtenidos en este estudio están marcados en letra roja.

3.2.6 Otros aislados

Adicionalmente a los aislados mencionados arriba, también se encontraron hongos pertenecientes a los géneros *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Actinomucor* sp., *Epicoccum* sp., *Curvularia* sp., que se caracterizaron molecularmente mediante el uso del marcador filogenético ITS (Fig. 19).

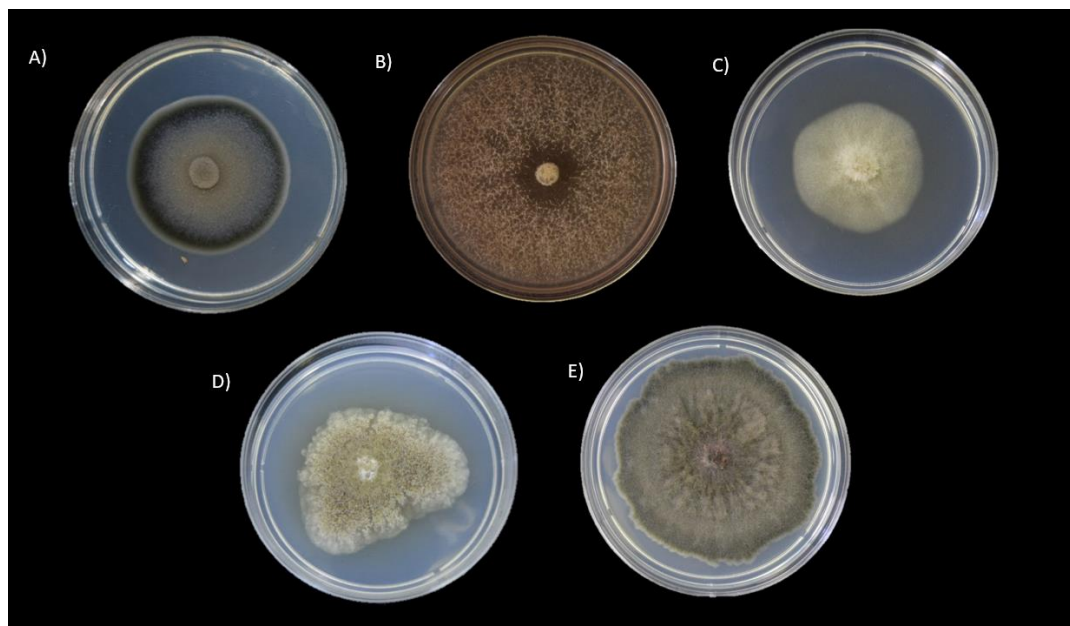


Figura 18. Morfotipos observados de otros géneros no causantes de enfermedades de madera. A) *Cladosporium* sp. B) *Chaetomium* sp. C) *Epicoccum* sp. D) *Chaetomium* sp. E) *Curvularia* sp.

La figura 20, resume los hallazgos encontrados en los 11 sitios analizados. La cepa con mayor prevalencia fue *P. stromaticum*, presente en diez de las once huertas muestreadas. *D. caatingaensis* se encontró en ocho huertas, *Fusarium* spp. se encontró en cinco huertas y *Lasiodiplodia* en ocho.

Sitio 1	<i>Diaporthe</i> sp. <i>Pseudofusicoccum</i> sp.	Sitio 2	<i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Botryosphaeria dothidea</i> <i>Libertella</i> sp.	Sitio 3	<i>Diaporthe</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp. <i>Pseudofusicoccum</i> sp. <i>Lasiodiplodia</i> sp.
Sitio 4	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. <i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Eutypella</i> sp.	Sitio 5	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. <i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Eutypella</i> spp. <i>Actinomucor</i> <i>Epicoccum</i>	Sitio 6	<i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Pseudofusicoccum</i> sp.
Sitio 7	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Paraconiothyrium</i> sp. <i>Cunninghamella</i> sp.	Sitio 8	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. <i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp.	Sitio 9	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Chaetomium</i> sp.
Sitio 10	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Curvularia</i> sp.	Sitio 11	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. <i>Lasiodiplodia</i> sp. <i>Diaporthe</i> sp. <i>Fusarium</i> sp.		

Figura 19. Resumen de los géneros de hongos encontrados por huerta.

3.3 Temperatura óptima de crecimiento

De los nueve aislados seleccionados para el ensayo de temperatura óptima, se encontró que la cepa M4T2A de *Lasiodiplodia* sp. tuvo una temperatura óptima de crecimiento de 25°C-30°C (Tabla 9). Ninguna de las cepas seleccionadas mostró crecimiento a 40°C, y solo las cepas M1T2CB y M10T6 de *P. stromaticum*, M4T2B de *E. microtheca* y M4T2A de *Lasiodiplodia* sp. mostraron poco crecimiento a 37°C. La temperatura óptima para las cepas de *P. stromaticum* se encontró a los 30°C con un crecimiento de la cepa M1T2B de 22.33 ± 2.67 mm/día. Las cepas M6T2A y M9T1B de *Diaporthe caatingaensis* tuvieron un crecimiento óptimo a 30°C, pero ninguna de las dos cepas creció a 37°C. Las cepas M7T7 y M9T1E de *F. incarnatum* y *F. arcuatisporum* respectivamente, tuvieron un crecimiento óptimo entre los 25°C-30°C, y no mostraron crecimiento a partir de los 37°C.

Tabla 9. Crecimiento micelial a diferentes temperaturas de nueve cepas fúngicas seleccionadas (mm/día).

Especie	Cepa	Temperatura				
		20°C	25°C	30°C	37°C	40°C
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	M4T2A	20.11 ± 2.7	22.11 ± 5.59	22.77 ± 4.06	1.94 ± 2.5	NG
<i>E. microtheca</i>	M4T2B	9.33 ± 1.67	11.16 ± 1.39	11.05 ± 0.87	0.77 ± 0.28	NG
<i>D. caatingaensis</i>	M6T2A	4.8 ± .86	5.11 ± 4.19	5.22 ± 0.86	NG	NG
<i>D. caatingaensis</i>	M9T1B	3.9 ± 5.67	7.33 ± 1.76	8.72 ± 2.19	NG	NG
<i>P. stromaticum</i>	M1T2B	13.7 ± 3.25	18.41 ± 0.84	22.33 ± 2.67	5.5 ± 1.39	NG
<i>P. stromaticum</i>	M10T6	8.3 ± 2.1	15.58 ± 2.6	18.5 ± 2.24	4.16 ± 1.97	NG
<i>F. incarnatum</i>	M7T7	5.22 ± 1.01	5.55 ± 1.14	4.33 ± 0.84	NG	NG
<i>F. incarnatum</i>	M9T1E	2.44 ± .58	3.22 ± 0.68	4.61 ± 1.27	NG	NG
<i>F. incarnatum</i>	M10T3B	4.05 ± 1.46	6 ± 2.47	3.94 ± 0.35	NG	NG

3.4 Pruebas de patogenicidad

Las plantas inoculadas con los aislados de *Lasiodiplodia* M4T2A (*Lasiodiplodia* sp.) y M5T3 (*L. brasilienses*) mostraron las lesiones necróticas más largas, de alrededor de 5 cm de longitud después de dos meses de la inoculación tanto interna como externamente (Figs. 21 y 22), seguidas de las cepas de *P. stromaticum* (M10T6 y M1T2B), las cuales generaron lesiones de una longitud mayor a los 2 cm. Las cepas de *E.*

microtheca, *F. incarnatum* y *D. caatingaensis* fueron menos virulentas, dado que las plantas inoculadas presentaron lesiones ≤ 2 cm de longitud. En el caso de las plantas control, también se observaron lesiones, aunque de menor tamaño y con una coloración más clara, lo que puede indicar la reacción de la herida de la planta, dado que al final del experimento no se aislaron hongos de las plantas control, mientras que en el resto se recuperaron solamente las cepas inoculadas.



Figura 21. Lesiones en la madera de plantas de nogal pecanero inoculadas con hongos aislados en este estudio. Se observaron lesiones oscuras de diferentes tamaños después dos meses de inoculación.

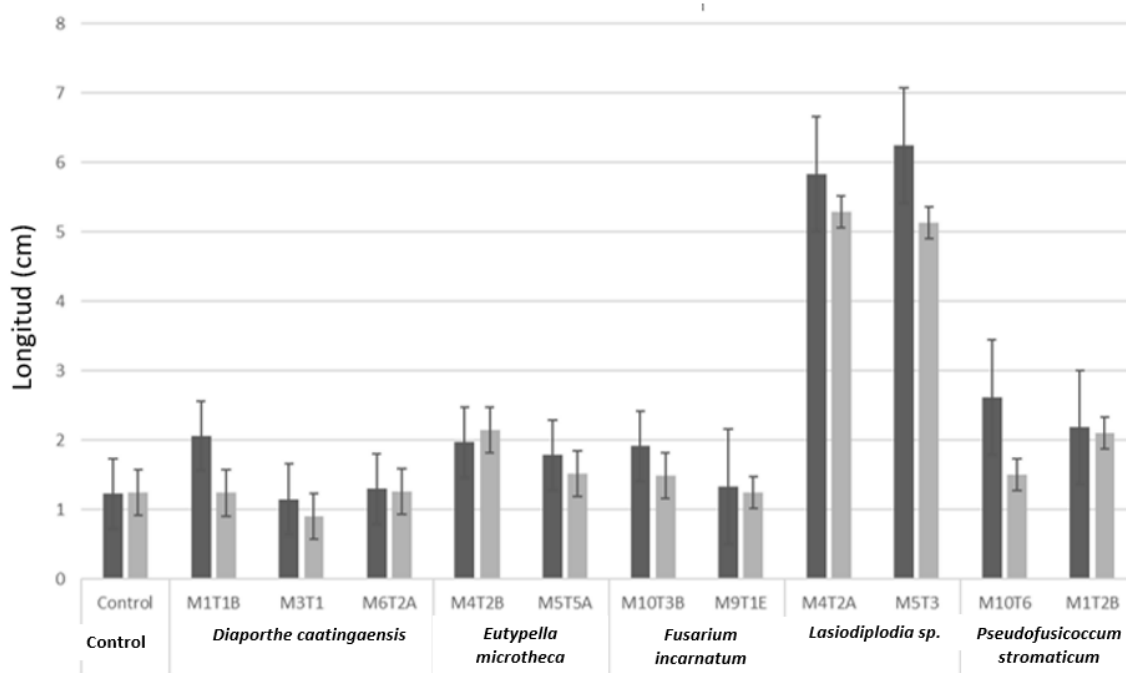


Figura 22. Lesiones causadas en tallos de nogal pecanero por once cepas de hongos seleccionadas. Las líneas delgadas indican la desviación estándar. Las barras de color gris claro indican el tamaño de la lesión observada en el exterior de la madera y en gris oscuro la lesión en el interior.

Capítulo 4. Discusión

Se identificaron una gran variedad de hongos de madera de nogal en Sonora, entre ellas dos especies de la familia Botryosphaeriaceae, *Diaporthe caatingaensis* y *Eutypella microtheca*. Estas especies han sido reportadas como patógenos de madera en otros cultivos. El manejo correcto de las enfermedades requiere de la identificación de los agentes causales, por lo que este trabajo contribuye con el conocimiento de los agentes causales del cancro en nogal y además representa varios primeros reportes de hongos asociados a nogal en México y en el mundo.

El análisis filogenético identificó la presencia de *P. stromaticum* como el agente causal del cancro en nogal más ampliamente distribuido en Sonora, presente en casi todos los sitios muestreados. Aunque se han reportado cepas de *Pseudofusicoccum*, afectando nogal pecanero en Brasil, éstas corresponden a *P. kimberleyense* (Rolim et al, 2020). *P. stromaticum* fue reportado en *Eucalyptus* y *Acacia* spp. en Venezuela (Mohali et al. 2006; 2007), en plantas nativas de áreas no perturbadas de Australia (Pavlic et al. 2008) y en Brasil en árboles de mango (Marques et al, 2012), manzana malaya (Silveira et al, 2018), nuez de la india (Netto et al., 2017) y anonáceas (Machado et al., 2019). Los conidios observados presentan características morfológicas similares a las reportadas anteriormente, con forma recta a ligeramente curvada y con medidas de 15.6 a 25.0 (20.8) μm de longitud y 2.7 a 7.9 (5.2) μm de ancho (Marques et al, 2012).

De acuerdo con los análisis de patogenicidad, en nogal *P. stromaticum* es un patógeno de virulencia intermedia, lo que coincide con lo reportado en nuez de la india (*Anacardium othonianum* (Netto et al., 2017). Sin embargo, el avance del hongo en un árbol infectado podría depender de la temperatura, ya que las cepas analizadas crecieron mejor a 37 °C (4.16 a 5.5 cm a 37 °C) que las cepas de *Lasiodiplodia*. (0.77 \pm 0.28 a 1.94 \pm 2.50 cm). Similarmente, en cepas de *P. stromaticum* aisladas de nuez de la india en Brasil, la temperatura óptima de crecimiento para *P. stromaticum* fue también mayor (32.3 °C) que la de *L. brasiliense* (31.2 °C), *L. jatrophiicola* (31.0 °C), *L. gravistriata*, *L. gonubiensis*, *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *L. iraniensis* (entre 30.1 °C to 30.7 °C) (Netto et al., 2017).

La capacidad de *P. stromaticum* de crecer a más altas temperaturas podría explicar su mayor presencia en nogales en Hermosillo, en donde las temperaturas extremas en verano llegan a los 49 °C (Román et al., 2017). Sería interesante realizar experimentos en plantas inoculadas con este hongo a diferentes temperaturas para evaluar el desarrollo de la enfermedad y predecir su comportamiento en las huertas de nogal de Sonora.

Por otro lado, la prevalencia de *P. stromaticum* en Sonora, indica que este género tiene una distribución mundial más amplia de lo que se había considerado anteriormente. Pavlic et al. 2008, indicaban que estas especies son nativas de Australia, pero los resultados de Netto et al., 2017, quienes encontraron a *P. stromaticum* en nuez de la india nativo en Brasil y los de este trabajo, contradicen esa aseveración dado que el nogal pecanero es originario del sureste de Estados Unidos de América y del norte de México (Gray, 1973).

Otras especies de Botryosphaeriaceae identificadas en este estudio fueron *Lasiodiplodia exigua* y *L. brasilienses*. Ambas especies están presentes en Sonora y Baja California afectando viñedos (Rangel-Montoya et al., 2021), pero esta es la primera vez que se reportan en nogal. *Lasiodiplodia* es un género que contiene varias especies patógenas que afectan a más de 500 especies de plantas ocasionando grandes pérdidas económicas (Burgess et al., 2006). En Brasil, *L. subglobosa* y *L. theobromae* se han reportado ocasionando canchros en nogal pecanero (Poletto et al., 2016; Rolim et al., 2020). En México la única especie reportada en nogal pecanero es *L. theobromae* que se encontró en Coahuila (Alvidrez-Villarrea et al., 2012). Otras Botryosphaeriaceae reportadas en nogal pecanero causantes de cancro del tronco incluyen a: *Botryosphaeria dothidea* en China (Yao et al., 2019), *Neofusicoccum parvum* y *P. kimberleyense* en Brasil (Rolim et al., 2020) y *Neofusicoccum caryigenum* en Estados Unidos (Brewer et al., 2021).

La temperatura óptima de crecimiento de las cepas de *Lasiodiplodia* se encuentra en los 30°C, lo cual concuerda con reportes previos (Netto et al., 2017; Rangel-Montoya et al., 2021). Esto demuestra lo adaptada que se encuentra esta especie a la zona, cuya temperatura máxima promedio es de 39°C durante junio, julio y agosto. La presencia de estas especies en nogal y la cercanía de los huertos de nogal con los viñedos, puede indicar una inoculación cruzada, en cuyo caso es difícil determinar cuál fue el primer cultivo infectado.

Todas las especies del género *Diaporthe* aisladas en este estudio se agruparon como *Diaporthe caatingaensis*. Aunque las especies de *Diaporthe* se han reportado a menudo como importantes patógenos de plantas, saprobios y endófitos en una amplia gama de plantas hospedantes (Dissanayake et al., 2017), actualmente no hay reportes de esta especie causando enfermedades de la madera. En México, este hongo se reportó como endófito de *Ageratina pichinchensis* (Axihuitl), una planta medicinal endémica del país (Luna et al., 2022). Aunque en los ensayos de patogenia las lesiones provocadas no fueron muy diferentes al control sin hongo, no se puede descartar su papel como patógeno en nogal. Es probable que

por su lento crecimiento y su preferencia a temperaturas entre 25 y 30°C necesite más tiempo para ocasionar lesiones en nogal, por ello se sugiere repetir estos ensayos de patogenia.

En Brasil, varias especies del género *Fusarium* son responsables de marchitez en árboles de nogal, incluidas las especies de *Fusarium oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. incarnatum* y *F. solani* (Lazarotto et al., 2014). En México, se reportó la presencia de *F. solani* y *F. oxysporum* como agentes causales de la muerte regresiva de la nuez pecana en asociación con el barrenador ambrosial *Euplatypus segnis* (Alvidrez-Villarreal, 2012). En este trabajo las cepas del género *Fusarium* encontradas presentaron dos morfologías, la primera dentro del grupo *F. incarnatum-equiseti*, cuyas cepas son difíciles de diferenciar morfológicamente entre sí (Barik et al, 2012) y *F. decemcellulare*, el cual se reportó como causante de canchales y muerte regresiva en árboles tropicales como aguacate, cacao y mango (Serrato-Díaz, 2015). En China *F. decemcellulare* se reportó por primera vez como causante de muerte regresiva en mango (Qi et al, 2013), la pigmentación rosa oscuro presente en las colonias descritas en ese trabajo concuerdan con las encontradas en este estudio, así como los micro y macro conidios. En México se reportó como causante de enfermedad de la escoba de Bruja en mango, así como causante de agallas en ramas del árbol Ebano en Nuevo León (Marmolejo et al, 2013).

Dos cepas identificadas en dos huertas pertenecen al género *Cladosporium* spp. La cepa M4T2C fue identificada mediante el marcador ITS como *Cladosporium uredinicola* y la cepa M2T5A como *C. subuliforme*. En nogal la especie *C. caryigenum* es conocida por ocasionar la enfermedad de la sarna del pecan "Pecan Scab". En Brasil se reportó en 2016, el complejo *C. cladosporioides* como causante de la enfermedad de la mancha en *Carya illinoensis* (Walker et al., 2016). Este complejo incluye una especie identificada en este estudio *C. subuliforme*. En nuestro país la única especie reportada que afecta nogal pecanero es *C. caryigenum* (Beck et al., 2005) y la especie *C. cladosporioides* como causante de la enfermedad de la mancha de la hoja en tomate (Robles et al., 2019). Debido al enfoque de este estudio hacia hongos de la madera, no se realizaron ensayos de patogenia con estas cepas, por lo que se sugiere estudiarlas para comprender su papel en las huertas de nogal.

Otra cepa identificada mediante ITS fue *Curvularia spicifera*, que se encontró en solo una huerta, con la cual tampoco se realizó el ensayo de patogenia, debido a que no está identificada como causante de enfermedades de la madera. En China durante el 2022, se publicó el primer reporte de una especie del género *Curvularia*, específicamente *C. muehlenbeckiae* causando la enfermedad de la mancha de la hoja en nogal pecanero (Lv et al., 2022). Nuevamente, es necesario realizar más investigación de este género en nogal pecanero para conocer si se puede considerar como hongo patógeno.

Otros hongos identificados en este estudio incluyen a *Chaetomium* sp., *Actinomucor* sp., *Epicoccum* sp. *Chaetomium* y *Epicoccum* que han sido reportados previamente como agentes de control biológico (Taguian et al., 2021), por lo que sería importante evaluar su potencial en el control de enfermedades de la madera.

Finalmente, los datos obtenidos aquí contribuyen con el conocimiento del estatus fitosanitario de las huertas de nogal en Sonora y sirven como base para establecer programas de manejo que permitan el control de los hongos identificados, con énfasis en el control de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae, que prevalecen en la zona.

Capítulo 5. Conclusiones

Se identificaron las especies *Pseudofusicoccum stromaticum*, *Lasiodiplodia exigua*, *L. brasiliense*, *Diaporthe caatingaensis*, *Eutypella microtheca*, y tres especies del género *Fusarium* en nogales de Sonora.

La cepa con mayor prevalencia fue *P. stromaticum*, presente en diez de las once huertas muestreadas. *D. caatingaensis* se encontró en ocho huertas, *Fusarium* spp. se encontró en cinco huertas y *Lasiodiplodia* en ocho.

Las cepas de *Lasiodiplodia* fueron las más virulentas, seguidas de las cepas de *Pseudofusicoccum* y *E. microtheca*, que presentaron virulencia intermedia. Las menos virulentas fueron las cepas de *D. caatingaensis* y *Fusarium* spp.

La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las cepas fue de 30°C; ninguna de las cepas evaluadas creció a 40°C, y solamente *P. stromaticum*, *E. microtheca* y *Lasiodiplodia* sp. mostraron poco crecimiento a 37°C.

Literatura citada

- Alasalvar, C. and Shahidi, F. (2008). Tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects: an overview. In tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects. Nutraceutical Science and Technology. doi: 10.1201/9781420019391.ch1
- Alvidrez-Villarreal, R. , Hernández-Castillo, F. , Garcia-Martínez, O. , Mendoza-Villarreal, R. , Rodríguez-Herrera, R. and Aguilar, C. (2012) Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. *Agricultural Sciences*, 3. doi: 10.4236/as.2012.33048.
- Beck A, Ritschel A, Schubert K, Braun U, et al. (2005). Phylogenetic relationships of the anamorphic genus *Fusicladium* s. lat. as inferred by ITS nrDNA data. *Mycol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-006-0114-8>
- Brewer, M. T., Cameron, C. J., Chan, C. T., Dutta, B., Gitaitis, R. D., Grauke, L. J., ... & Brenneman, T. B. (2021). *Neofusicoccum caryigenum*, a new species causing leaf dieback disease of pecan (*Carya illinoensis*). *Mycologia*, 113(3).
- Briceño-Contreras, E. A., Moreno-Reséndez, A., Valenzuela-Núñez, L. M., García-De la Peña, C., Esparza-Rivera, J. R., Rodríguez-Martínez, R., and Molina-Ochoa, J. (2019). Influence of temperature and irradiation on starch concentration in *Carya illinoensis* K. Koch varieties Wichita and Western. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 25(3). doi: 10.5154/r.rchscfa.2018.12.089
- Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, de Beer W, Wingfield MJ. (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia*. May-Jun;98(3). doi: 10.3852/mycologia.98.3.423. PMID: 17040071.
- Carbone, I. and Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. Taylor & Francis, 91(3). doi: 10.1080/00275514.1999.12061051
- Chen, S. F., Fichtner, E., Morgan, D. P., and Michailides, T. J. (2013). First Report of *Lasiodiplodia citricola* and *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Death of Graft Union of English Walnut in California. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-12-1000-PDN>. The American Phytopathological Society , 97(7). doi: 10.1094/PDIS-10-12-1000-PDN
- Chen, S., Morgan, D. P., and Hasey, J. K. (2014a). Phylogeny, Morphology, Distribution, and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English Walnut in California. doi: 10.1094/PDIS-07-13-0706-RE
- Chen, ShuaiFei & Morgan, David & Michailides, Themis. (2014 b). *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* associated with panicle and shoot blight of pistachio in California, USA. *Fungal Diversity*. 67. doi: 10.1007/s13225-014-0285-6.
- Dissanayake, A. J., Phillips, A. J. L., Hyde, K. D., Yan, J. Y., & Li, X. H. (2017). The current status of species in *Diaporthe*. *Mycosphere*, 8(5).
- Gallegos Antonio. (2016). Principales plagas del nogal pecanero (*Carya illinoensis* K.) en la región norte-centro de México. Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro.
- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. (1995). Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR To Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. In *applied and environmental microbiology* (Vol. 61). <https://journals.asm.org/journal/aem>

- Gray, O. S. (1973). Consider pollen when planting. *The Pecan quarterly*, 7(3).
- Hall, T. (1999). BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, pp. 95–98. recuperado en agosto 10, 2021 de <https://ci.nii.ac.jp/naid/10030689140>
- Kris-Etherton, P. M., Hu, F. B., Ros, E., and Sabaté, J. (2008). The Role of Tree Nuts and Peanuts in the Prevention of Coronary Heart Disease: Multiple Potential Mechanisms. *The Journal of Nutrition*. Oxford Academic, 138(9). doi: 10.1093/JN/138.9.1746S
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6).
- Lazarotto, M., Milanesi, P. M., Muniz, M. F. B., Reiniger, L. R. S., Beltrame, R., Harakava, R., & Blume, E. (2014). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp pathogenic to pecan tree in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 13(4).
- Li, G. Q., Liu, F. F., Li, J. Q., Liu, Q. L., and Chen, S. F. (2016.) Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from English Walnut in China. *Journal of Phytopathology*, 164(5). doi: 10.1111/jph.12422
- Lv S, Zhang Y, Zhang C, Xiao L. (2023). First report of *Curvularia muehlenbeckiae*, the causal agent of *Curvularia* leaf spot on pecan (*Carya illinoensis*) in China. *Plant Dis*. doi: 10.1094/PDIS-07-22-1516-PDN. Epub ahead of print. PMID: 36040222.
- Luna, V. C., Hernández, A. R., Monroy, M. R., Robledo, N., & Sepúlveda-Jiménez, G. (2022). Identificación de hongos endófitos de *Ageratina pichinchensis* con actividad antagonica contra fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 13(6).
- Marincic, I., Ochoa, J. M., Alpuche, M. G., Duarte, A., Vargas, L., González, I. & Huelsz, G. (2011). La construcción actual de viviendas en Hermosillo y su adecuación al clima por medios pasivos. *Memorias de la XXXV Reunion Nacional de Energia Solar, ANES, Chihuahua, Mexico*.
- Marques, M. W., Lima, N. B., Michereff, S. J., Câmara, M. P. S., & Souza, C. R. B. (2012). First Report of Mango Dieback Caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. *Plant Disease*, 96(1) <https://doi.org/10.1094/pdis-05-11-0425>
- Michailides, T., Felts, D. G., Luo, Y., Brisach, C. A., Moral, J., Puckett, R., Brown, P., Gonzalez, D., Hasey, J., Lampinen, B., Symmes, E. J., Buchner, R. P., Lightle, D., and Fichtner, E. 2018. Epidemiology and management of *Botryosphaeria/Phomopsis* canker and blight and anthracnose blight of walnut in California: Vol. B.
- Moral, J., Morgan, D., and Michailides, T. J. (2019a). Management of *Botryosphaeria* canker and blight diseases of temperate zone nut crops. *Crop Protection*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.cropro.2019.104927
- Moral, J., Morgan, D., Trapero, A., and Michailides, T. J. (2019b). Ecology and epidemiology of diseases of nut crops and olives caused by *botryosphaeriaceae* fungi in California and Spain. *Plant Disease*, 103(8). doi: 10.1094/PDIS-03-19-0622-FE
- Netto MSB, Lima WG, Correia KC et al., (2017). Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Biology* .

- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. *Mol Phylogenet Evol*, 7(1), doi: 10.1006/MPEV.1996.0376
- Ortega-Acosta, Santo Ángel, Hernández-Morales, Javier, Sandoval-Islas, José Sergio, Ayala-Escobar, Victoria, Soto-Rojas, Lauro, & Alejo-Jaimes, Antonio. (2015). Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad "Pata Prieta" de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(2)
- Ortiz-Quezada, A. G., Lombardini, L., & Cisneros-Zevallos, L. (2011). Antioxidants in pecan nut cultivars [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 881-889). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10104-5
- Samaniego-Gaxiola, J. A., Aguilar-Pérez, H., & Pedroza-Sandoval, A. (2015). Epidemiología de la mancha vellosa (*Mycosphaerella caryigena*) y su impacto en la defoliación del nogal pecanero. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(2), 211-218.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. *Stud Mycol*, 76(1), doi: 10.3114/sim0021
- Qi, Y. X., Pu, J. J., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Y., Yu, Q. F., ... & Xie, Y. X. (2013). First report of dieback of mango caused by *Fusarium decemcellulare* in China. *Journal of Phytopathology*, 161(10).
- Rangel Montoya, E. A., Paolinelli, M., Rolshausen, P. E., Valenzuela Solano, C., & Hernandez Martinez, R. (2021). *Characterization of Lasiodiplodia species associated with grapevines in Mexico*. *Mediterranean Phytopathological Union*. 60(2), doi: 10.36253/phyto-12576.
- Robles-Yerena, L., Ayala-Escobar, V., Leyva-Mir, S. G., Lima, N. B., Camacho-Tapia, M., & Tovar-Pedraza, J. M. (2019). First report of *Cladosporium cladosporioides* causing leaf spot on tomato in Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 101(3).
- Rolim, Jessica Mengue et al. (2022) Fungi of the Botryosphaeriaceae family cause different levels of stem canker on pecan trees (*Carya illinoensis*) in Brasil. *Revista Árvore* [online]., v. 46, e4615. Available from: ISSN 1806-9088. <https://doi.org/10.1590/1806-908820220000015>.
- Román Román, Leonardo, Díaz Valdés, Tomás, López Avendaño, Jesús Enrique, Watts, Christopher, Cruz Bautista, Fidencio, Rodríguez Casas, Julio, & Rodríguez, Julio Cesar. (2017). Evapotranspiración del cultivo de sandía (*Citrullus lanatus*) en la costa de Hermosillo, Sonora, México. *Terra Latinoamericana*, 35(1).
- Serrato-Diaz, L. M., Perez-Cuevas, M., Rivera-Vargas, L. I., Goenaga, R., & French-Monar, R. D. (2015). First report of *Fusarium decemcellulare* causing inflorescence wilt and vascular and flower necrosis of rambutan (*Nephelium lappaceum*), longan (*Dimocarpus longan*), and mango (*Mangifera indica*). *Plant disease*, 99(8).
- SIAP. 2021. Panorama Agroalimentario (2021). Mexico. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>.
- Silveira, G. F., Melo, M. P., Teixeira, J. W. M., Viana, D. C., Silva, J. D. C., & Beserra Jr, J. E. A. (2018). First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Pseudofusicoccum stromaticum* causing dieback in *Syzygium malaccense* tree in Brazil. *Forest Pathology*, 48(2), e12408.
- Taguiam, J.D., Evallo, E. & Balendres, M.A. (2021). *Epicoccum* species: ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents. *Eur J Plant Pathol* 159. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02207-w>

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 22(22). doi: 10.1093/NAR/22.22.4673
- Wagner, D. B., Furniert, G. R., Saghai-marroof, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., and Allard, R. W. (1987). Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids (organelle DNA/paternal inheritance/introgression). In *Population Biology* (Vol. 84).
- Walker C, Muniz MF, Rolim JM, Martins RR, Rosenthal VC, Maciel CG, Mezzomo R, Reiniger LR. (2016) Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot. *Genet Mol Res*. Sep 16;15(3). doi: 10.4238/gmr.15038714. PMID: 27706736.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In *PCR Protocols*. doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
- Yao, J., Mei, L., Jiang, H., Hu, G., & Wang, Y. (2019). Evaluation of *Carya cathayensis* resistance to *Botryosphaeria* trunk canker using grafting on pecan. *Scientia Horticulturae*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.014>