



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

**IDENTIFICACIÓN Y COMPORTAMIENTO DEL ANILLAMIENTO
DEL PEDÚNCULO DEL FRUTO DE AGUACATE (*Persea americana* Mill)**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

PRESENTA

CITLALY SANTIAGO PEREZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. CARMELA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Mayo de 2020



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

**IDENTIFICACIÓN Y COMPORTAMIENTO DEL ANILLAMIENTO DEL
PEDÚNCULO DEL FRUTO DE AGUACATE (*Persea americana* Mill)**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

PRESENTA

CITLALY SANTIAGO PEREZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. CARMELA HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

ASESORES

DR. RAUL BERDEJA ARBEU

M.C. FABIEL VAZQUEZ CRUZ

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Mayo de 2020

La presente tesis titulada: **Identificación y comportamiento del anillamiento del pedúnculo del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill)** y realizada por **Citlaly Santiago Pérez**, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el Título de:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AGROHIDRÁULICA

Facultad de Ingeniería Agrohidráulica

Consejo Particular integrado por:

Firma

Director: Dra. Carmela Hernández Domínguez

Asesor: Dr. Raúl Berdeja Arbeu

Asesor: M.C. Fabiel Vázquez Cruz

San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. Mayo de 2020

El presente trabajo forma parte del Cuerpo Académico denominado: **Agrobiotecnología y Recursos Naturales** y de la Línea de Investigación: **Hongos fitopatógenos**. Dicho trabajo, fue financiado con recursos propios.

Dedicatoria

A mi hija Yaretzi por ser el motor de mi vida y ser mi inspiración para salir adelante día con día te amo.

A mis padres Catalina y Rogelio quienes me apoyaron durante mi formación profesional estando tan cerca y al pendiente de mí en todo momento. Gracias papas por ayudarme a cumplir un sueño más. Gracias papas por confiar en mí y por todos los consejos que me seguirán sirviendo durante mi vida.

A mis hermanas Xochilt y Ariadna por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mi compañero de batallas Antonio por estar siempre presente y gracias por todo el apoyo que me brindas y ser el impulso que necesito cuando tengo miedo.

A mis amigos Omar, Mariela, Lore, Lesly, Víctor, Cecy, José y Anita por todos los momentos divertidos, por los consejos que me dieron y por extender su mano en momentos difíciles. A ti Katia que a pesar de la distancia y de los años siempre has estado para mí, mil gracias.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta gran familia, en especial a la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica gracias por permitirme cosechar los frutos del conocimiento durante mi formación profesional.

A la Dra. Carmela Hernández por todo el apoyo que me brindo en la realización de la presente investigación, por su paciencia, por su confianza y los valiosos conocimientos y consejos brindado durante mi desarrollo profesional.

Al Dr. Raúl Berdeja Arbeu por dedicar su tiempo para la realización de este trabajo, por su valiosa asesoría y por los consejos y palabras de aliento que siempre tuvo durante mi estancia en la Facultad.

Al M.C. Fabiel Vázquez Cruz por dedicar su tiempo en la revisión y ayuda en la elaboración de esta tesis.

A mis amigos y compañeros por la ayuda brindada durante mi formación profesional.

Índice

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE ANEXOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRAC	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo general	2
2.2. Objetivos específicos	2
III. HIPÓTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Generalidades del aguacate	4
4.1.1. Origen	4
4.1.2. Descripción morfológica	4
4.1.3. Descripción Taxonómica	5
4.2. Importancia económica	6
4.3. Principales enfermedades y plagas del Aguacate	8
4.3.1. Anillamiento del pedúnculo	9
V. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1 Localización del experimento	11
5.2. Material vegetal.	11
5.3. Identificación del agente causal	12
5.3.1 Aislamiento del agente causal del anillamiento del pedúnculo	12
5.3.2. Descripción morfológica y molecular del agente causal del anillamiento del pedúnculo	12
5.3.2.1. Extracción de ADN	13
5.3.2.2. Amplificación molecular del ADN extraído	13
5.4. Evaluación de daño por el agente causal del anillamiento del pedúnculo en fruto de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill) dependiendo del estrato, la época de muestreo y la orientación donde se encuentran los frutos	14

5.5. Efecto de la temperatura y precipitación sobre la cantidad de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo.....	16
5.6. Análisis de datos y variables a medir en el experimento.....	17
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1. Identificación del agente causal.....	18
6.1.2. Descripción morfológica y molecular del agente causal.....	19
6.2. Evaluación de daño por el agente causal del anillamiento del pedúnculo en fruto de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill) dependiendo del estrato, la época de muestreo y la orientación donde se encuentran los frutos.....	21
6.3. Efecto de la temperatura y precipitación sobre la cantidad de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo tomando en cuenta el factor B (Orientación) y como tratamiento la orientación norte de todos los muestreos.....	24
VII. CONCLUSIÓN.....	27
VIII. LITERATURA CITADA.....	28
IX. ANEXOS.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales países productores de aguacate en el mundo.	7
Cuadro 2. Estados productores de aguacate.	7
Cuadro 3. Producción del estado de Puebla por Distrito.	8
Cuadro 4. Mezcla de reacción para amplificación de ADN para la región ITS.	13
Cuadro 5. Condiciones utilizadas en la amplificación del ADN para la región ITS.	14
Cuadro 6. Tratamientos.	15
Cuadro 7. Cepas aisladas dependiendo de la localidad, sitio en el fruto y variedad de aguacate.	18
Cuadro 8. Datos transformados con la función $\sqrt{1/X}$ obtenidos de observaciones y conteos de frutos enfermos en tres fechas de muestreos del año 2019.	21
Cuadro 9. Resultados del análisis ANOVA de datos transformados, obtenidos de conteos de frutos enfermos de aguacate en tres fechas de muestreos del año 2019.	22
Cuadro 10. Diferencias de medias Tukey del factor B (Orientación) analizado como tratamiento en el primer muestreo.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de establecimiento del experimento. San Juan Acateno, Teziutlán Puebla..	11
Figura 2. Enumeración de sitios de tejido analizado.....	12
Figura 3. Estratificación del árbol de aguacate muestreado	16
Figura 4. Fruto dañado por anillamiento (A), Aislamiento de <i>Alternaria alternata</i> con micelio oscuro crecido sobre papel celofán a 32 °C+/- 2 °C (B). Fragmosporas con dos septos trasversos (Ca). Fragmosporas con un septo trasverso (Db).	209
Figura 5. Filogenia de aislados de <i>Alternaria alternata</i> inferencia del análisis neighbor joining de los datos de la región ITS, tomando como referencia secuencias de la colección NCBI. Solo se muestran los valores de bootstrap arriba del 80 %	20
Figura 6. Porcentaje de árboles dañados por anillamiento del pedúnculo muestreado en tres fechas diferentes y con diferente orientación.	23
Figura 7. Porcentaje de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo muestreado en tres fechas diferentes y con diferente orientación. Frutos dañados y temperatura de muestreo (A), frutos dañados y precipitación (B).....	25
Figura 8. Temperatura, precipitación y porcentaje de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo muestreado en tres fechas diferentes en los estratos alto (A), medio (B), y bajo (C).....	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. ADN.....	32
Anexo 2. Preparación de medio de cultivo agar dextrosa y papa (ADP).....	32
Anexo 3. Protocolo de Extracción de ADN Quiagen modificada.....	32
Anexo 4. Resuspensión de Primers	33
Anexo 5. Anexo 5. Preparación de gel de agarosa 1.5 %.....	33

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el fin de evaluar el daño por el agente causal del anillamiento del pedúnculo en frutos de árboles de aguacate (*Persea americana* Mill) dependiendo del estrato de copa, la orientación, así como la temperatura, precipitación y época de muestreo. Así como identificar el agente causal del anillamiento del pedúnculo y determinar el porcentaje de frutos dañados con anillamiento del pedúnculo por árbol dependiendo del estrato de copa y la orientación. Para la identificación del agente causal del anillamiento del pedúnculo se aislaron 10 cepas de 2 huertas diferentes, las cepas se caracterizaron por presentar una tonalidad oscura a negra con micelio liso. La observación morfológica mostro estructuras de micelio denominadas fragmosporas las cuales se observaron con tabiques con 1 a 2 septos y 4 septos. El producto amplificado por PCR mostraron bandas con 400 Bp, este al ser secuenciado y comparado con el banco de genes NSBI mostro que tiene el 99% de identidad con el hongo *Alternaria alternata*. La parte Norte de los tratamientos presentaron un porcentaje mayor de daños en comparación a los demás tratamientos que fueron Sur, Este y Oeste. En cuanto a los estratos de copa el análisis estadístico no mostro diferencias significativas entre los niveles alto, medio y bajo. Las condiciones climáticas para que la enfermedad anillamiento del pedúnculo afecto de manera considerable son menores a 27°C y menor precipitación.

Palabras claves: Anillamiento del pedúnculo, aguacate, estrato de copa, orientación, *Alternaria alternata*.

ABSTRAC

The present investigation was carried out in order to evaluate the damage caused by the causal agent of the stem end rot of the in fruits of avocado trees (*Persea americana* Mill) depending on the layer stratum, the orientation, as well as the temperature, precipitation and the sampling season. As well as identifying the causal agent of the avocado stem end rot of the and determining the percentage of damaged fruits with avocado stem end rot of the per tree depending on the crown layer and the orientation. To identify the causal agent of the avocado stem end rot, 10 strains from 2 different orchards were isolated, the strains were characterized by having a dark to black hue with smooth mycelium. Morphological observation showed mycelial structures called fragmospores which were observed with septa with 1 to 2 septa and 4 septa. The product amplified by PCR showed bands with 400 Bp, this when sequenced and compared with the NSBI gene bank showed that it has 99% identity with the *Alternaria alternata* fungus. The North part of the treatments presented a higher percentage of damages compared to the other treatments that were South, East and West. As for Tree top strata, the statistical analysis did not show significant differences between the high, medium and low levels. The climatic conditions for the Avocado Stem End Rot to affect considerably are less than 27 ° C and less precipitation.

Key words: Stem End Rot, avocado, treetop levels, orientation, *Alternaria alternata*.

I. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill) es un árbol perenne de la familia *Lauraceae* que posee un alto valor nutritivo, y es parte esencial de la dieta humana. Este cultivo originario de Mesoamérica, actualmente se distribuye en todo el mundo, siendo México el principal país productor de fruto (Galindo-Tovar *et al.*, 2008) con 1, 997,629 toneladas distribuidas en una superficie mayor a las 124,620 ha, y sus exportaciones rebasan los 557,734 millones de pesos, dejando una gran cantidad de divisas a varias familias mexicanas (SIAP, 2017).

A pesar de los múltiples beneficios que aporta éste cultivo, su producción se ve afectada constantemente por diferentes problemas que disminuyen su rendimiento, como son, los relacionados con plagas y enfermedades, los cuales se presentan en diferentes estaciones del año.

Una de las principales enfermedades que limita considerablemente los rendimientos del cultivo, es el anillamiento del pedúnculo, debido a que cada año los árboles experimentan una caída considerable de fruta antes de llegar a la madurez comercial, disminuyendo así los ingresos económicos derivados de dicha producción (Bisono y Hernández, 2008). El daño que provoca el anillamiento del pedúnculo es una muerte celular del tejido que conecta al pedúnculo y al fruto de aguacate, dicha muerte celular con el paso del tiempo se va extendiendo desde el punto de conexión de éstas dos partes, hacia el pedúnculo, y hacia el fruto. Cuando el daño ha avanzado sobre la cascara del fruto, ésta zona toma una tonalidad violeta que posteriormente cambia a café claro antes de perder la conexión con el pedúnculo (Morales y Palomares, 2009).

Actualmente se desconoce los agentes que provocan este daño, y los productores que han experimentan éste problema, lo catalogan como resultado de un problema nutricional, sin embargo, a pesar de atenderlo como tal, no han tenido resultados exitoso (CESAVEG, 2007). Por otra parte también se desconoce el efecto que tienen los factores climáticos como la temperatura y la precipitación sobre el comportamiento de la enfermedad. Por lo anterior, en esta investigación se pretende determinar las causas que provocan el anillamiento del pedúnculo así como el efecto de temperatura y la precipitación.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Evaluar el daño por el agente causal del anillamiento del pedúnculo en frutos de árboles de aguacate (*Persea americana* Mill) dependiendo del estrato, la orientación, así como la temperatura, precipitación y época de muestreo.

2.2. Objetivos específicos

- Identificación del agente causal del anillamiento del pedúnculo del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill).
- Determinar el porcentaje de frutos dañados con anillamiento del pedúnculo por árbol dependiendo del estrato de copa, y la orientación así como la época de muestreo.
- Determinar el efecto de la temperatura y precipitación sobre el porcentaje de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo.

III. HIPÓTESIS

La caída prematura del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill) podría ser causa de la infección temprana de un conjunto de hongos que provocan síntomas de anillamiento en el pedúnculo, dicha caída depende el lugar donde se encuentran los frutos en el árbol, así como la orientación de éstos, la temperatura existente y la precipitación ambiental.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Generalidades del aguacate

4.1.1. Origen

El aguacate (*Persea americana* Mill) es una importante fruta tropical que desde tiempos muy antiguos se desarrolló en la región alta del centro de México y Guatemala, lo que antes era conocido como Mesoamérica, de ahí se dispersó hacia Sudamérica por las culturas que habitaron en esa región en la época prehispánica (Galindo-Tovar *et al.*, 2007).

Uno de los lugares que es considerado como centro de origen del aguacate criollo (*P. americana* var. *drymifolia*), es el estado de Nuevo León en México, sin embargo, los restos fósiles de semillas de aguacate los cuales tienen una antigüedad de 8,000-7,000 años A.C., encontrados en cuevas de Coxcatlán y Valle de Tehuacán indican que probablemente existieron árboles nativos que fueron plantados cerca de arroyos hace 6,500 años y crecían al este del estado de Puebla (Galindo-Tovar *et al.*, 2008).

De acuerdo a las evidencias de restos de semillas encontradas a lo largo del tiempo, se puede afirmar que el aguacate ha sido incorporado a la dieta de la población mexicana y Centroamericana desde hace varios siglos y debido a su consumo creciente éste fruto se difundió a otros lugares fuera del continente, y posteriormente, se empezó a exportar a diferentes países como Europa y Asia (Moreno-Limón *et al.*, 2010).

4.1.2. Descripción morfológica

El aguacate es un árbol extremadamente vigoroso, de tronco potente, con ramificaciones vigorosas que puede alcanzar hasta 30 m de altura las cuales están conformadas de hojas, flores y frutos característicos.

Hojas: Son simples, enteras alternas, de forma oblanceolada, nervadura pinnada y ápices agudos; la inserción en el tallo es peciolada. Cuando son jóvenes son de color rojizo, con epidermis pubescente y al llegar a la madurez se tornan lisas coriáceas y de color verde oscuro brillante en el haz, mientras que el envés tiene un color claro desprovisto de brillo “La

hoja es un órgano muy dinámico, en el que la concentración de nutrimentos está cambiando continuamente, influenciada por diferentes factores. La edad de la hoja y etapa fenológica tiene una influencia muy marcada sobre su composición.” (Bisonó y Hernández, 2008).

Flores: Las flores son de color amarillo verdoso, y de un diámetro 1-1.3 cm, las flores son hermafroditas, primero como femeninas, después cierran y vuelven a abrir como masculinas. Cada árbol puede llegar a producir hasta un millón de flores y sólo el 0.1 % se transforman en fruto (Bisonó y Hernández, 2008)

Frutos: Bisonó y Hernández (2008) mencionan que el fruto es una baya carnosa, sin endocarpio lignificado o endurecido, y puede ser de superficie lisa o rugosa. Su forma va desde elipsoide, obovado a obovoide. Su color es verde, oscureciéndose en la madurez y tomando un color violáceo a negro al madurar. El peso es diferente según el tipo ecológico, que va desde 50 gramos a 2.5 kg.

4.1.3. Descripción Taxonómica

El aguacate taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Familia: Lauráceas.

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana* (85 especies)

La familia Lauraceae

Esta familia a la que pertenece el aguacate es numerosa, e incluye alrededor de 3,500 especies agrupadas en 55 géneros, entre los cuales se encuentran: *Persea* (aguacate), *Laurus* (laurel), *Cinnamomum* (canela), *Cassia* (alcanforero) y *Sassafras* (sasafrás). Otros géneros importantes son *Ocotea*, *Aniba*, *Litsea*, *Chlorocardium*, *Endiandra* y *Eusideroxylon* (Chanderbali et al., 2008).

El género *Persea*

El género *Persea* (Miller), reúne árboles o arbustos con hojas alternas, subverticiladas, penninervadas, glabras o pubescentes; las inflorescencias paniculadas, tirsoideas, racemosas o capitadas, axilares o pseudoterminales; flores hermafroditas, campanuladas; tépalos 6, ovados, elípticos u oblongos, semejantes entre sí, o los exteriores más pequeños que los interiores, glabros o pubescentes, verde amarillentos, deciduos o persistentes; estambres fértiles 9, los filamentos más largos que las anteras, los tres interiores con glándulas en la base, anteras con cuatro esporangios; hipanto corto, plano; ovario ovoide o globoso; fruto asentado directamente en un pedicelo más o menos engrosado, sin cúpula, cuando los pétalos son persistentes, se observan fuertemente imbrincados formando un tubo corto (Chanderbali *et al.*, 2008).

Todos los taxa que se conocen como aguacates pertenecen al género *Persea*, y dentro de éste se reconocen tres subgéneros: *Persea* (sólo en América), caracterizado por la presencia de tépalos iguales, totalmente deciduos en el fruto; *Eriodaphne* (sólo en América), con tépalos desiguales y persistentes en el fruto; y *Machilus* (sólo en Asia), con tépalos iguales, persistentes y reflexos en el fruto (Moreno-Limón *et al.*, 2010) el cual incluye en la actualidad cerca de 85 especies, la mayoría de ellas distribuidas en América, desde Estados Unidos hasta Chile.

En México se encuentran de 10 a 12 especies las cuales que son abundantes en bosques mesófilos de montaña y bosques de pino o encino.

4.2. Importancia económica

La importancia del aguacate en el mercado internacional ha crecido sostenidamente, dejando de ser una fruta exótica para incorporarse en la dieta de muchos países. Esta tendencia creciente en el consumo de productos naturales a nivel internacional ha hecho que la explotación comercial se haya incrementado en 550,000 toneladas durante los últimos 15 años (Téliz y Mora, 2007). Actualmente, México ocupa el primer lugar en la producción de aguacate a nivel mundial (Cuadro 1), contribuyendo con el 27 % del total de la producción (FAOSTAT, 2016).

Cuadro 1. Principales países productores de aguacate en el mundo.

País productor	Porcentaje del total producido a nivel mundial
México	27 %
Chile	8 %
Rep. Dominicana	7 %
Indonesia	6 %
Colombia	5 %
Perú	5 %
Resto	43 %

Fuente: FAOSTAT, 2016.

La evolución del aguacate como cultivo de importancia dentro de la República Mexicana se evidencia en el constante incremento del volumen producido y de nuevas áreas destinadas a la producción de este fruto. De acuerdo a éste crecimiento constante, en el 2017 la superficie sembrada alcanzó más de 124,620 ha (SIAP, 2017), siendo Michoacán el estado con mayor superficie sembrada y producción obtenida de éste cultivo, ocupando el primer lugar seguido por Jalisco, el Estado de México y Nayarit (Cuadro 2). Lo cual generó ganancias superiores a los 18.06 millones de pesos (SIAP, 2017).

Cuadro 2. Estados productores de aguacate.

Principales estados productores	Producción en volumen
Michoacán	1.19 Millones de toneladas
Jalisco	87, 367 toneladas

Estado de México	56,672 toneladas
Nayarit	34,345 toneladas

Fuente: SIAP, 2017.

A nivel nacional el estado de Puebla ocupa el 7° lugar, con una producción total de 7,576 toneladas y una superficie sembrada de 3177 ha, siendo Cholula, Libres y Teziutlán los distritos de mayor importancia (Cuadro 3). En el 2017, este último ocupó el tercer lugar en producción de aguacate con una producción total de 579 toneladas (SIAP, 2017).

Cuadro 3. Producción del estado de Puebla por Distrito.

Distrito	Superficie sembrada (ha)	Producción (ton)
Cholula	762	4,622
Izúcar de Matamoros	26	36
Libres	1,075	1,519
Tecamachalco	196	250
Tehuacán	55	70
Teziutlán	650	579
Zacatlán	413	500

Fuente: SIAP 2017.

4.3. Principales enfermedades y plagas del Aguacate

El aguacate es un cultivo que constantemente es atacado por una diversidad de plagas y enfermedades entre las que se encuentran: la Araña roja (*Olygonychus punicae* H), Trips (*Liothrips perseae* W), Barrenador pequeño de la semilla (*Conotrachelus perseae* B),

Barrenador de troncos y ramas (*Copturus aguacatae* k), Araña cristalina (*Oligonychus perseae* T, B y A), gusano telarañero, thrips (*Thysanoptera*), nematodos y ácaros (Bisono y Hernández, 2008). Por otra parte, Morales (2009) menciona que el aguacate es atacado por enfermedades como: Antracnosis, Viruela, clavo, Sarampion, Marchitez de plantas, tizón floral (*colletotrichum*). Roña (*Sphalocema perseae*) anillamiento de pedúnculo (*diplodia sp*; *Alternaria sp*; *helminthosporium sp*; *Dothiorella sp*; *Colletotrichum gloeosporioides*, *pestalotiopsis sp.* y *Xanthomonas sp.*) Agalla de corana (*Agrobacterium tumefaciens*), Mancha del sol, pudrición del fruto (*Phytophthora citricola*) y tizón de la hoja (*pestalotiopsis versicolor*).

Tristeza del aguacatero (*Phytoptora cinnamomi*), Roña (*Sphaceloma perseae* J), Pudrición negra del fruto (*Phytoptora boehmeriae*), Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporoides* Penz) (Caballero, 2007) entre otras no identificadas.

4.3.1. Anillamiento del pedúnculo

Una de las alteraciones constantes y que causa reducción en la producción de aguacate en la región de Teziutlán es la caída de frutos por anillamiento de pedúnculo. Esta anomalía afecta el proceso de crecimiento debido a que ataca en tamaño mediano, comúnmente llamado “canica”. (Morales y Palomares, 2009) En esta etapa, cuando las plantaciones no tienen riego y reciben fuertes aplicaciones de fertilización nitrogenadas, en condiciones de alta humedad, es cuando el problema se acentúa. Esta alteración incide drásticamente más en la variedad *Hass* cuando se da el cambio de la estación seca a la estación lluviosa (Morales y Palomares, 2009)

El daño comienza con un cambio de coloración del verde oscuro normal para tornarse violenta sobre la cascara que se encuentra muy cerca al pedúnculo, posteriormente las células que forman el tejido del pedúnculo, aproximadamente a 1 cm del fruto, comienzan a tomar una coloración de café claro a oscuro, aparentando una especie de ahorcamiento. Finalmente, la corteza se torna necrótica, y el fruto dañado se desprende o permanecer adherido al pedúnculo (CESAVEG, 2007).

Delgado y Villanueva (2014) identifico como agente causal del anillamiento del pedúnculo en aguacate a los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Alternaria sp.* La pudrición de pedicelo se controla al cosechar los frutos con pedúnculo largo (10 mm) para evitar que los hongos penetren hasta la pulpa, y no ocasionar daños mecánicos al fruto durante la cosecha, transporte, empaque y almacenamiento. En campo se aplican productos ricos en Zinc (Morales, 2001) ya que esta enfermedad también se atribuye a la deficiencia de este elemento.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización del experimento

El trabajo se realizó en la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica ubicada en San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla (Figura 1). Se encuentra en las coordenadas GPS: Longitud (dec): -97.367222, Latitud (dec): 19.876389, y a una altura de 1617 msnm (INEGI, 2018). El área designada para este experimento es el área designada para fruticultura donde se encuentra establecido el cultivo de aguacate *Hass*. Adicional a esto se hizo un segundo muestreo en Tlatlauquitepec con el objetivo de corroborar la existencia del mismo patógeno asociado a anillamiento del pedúnculo

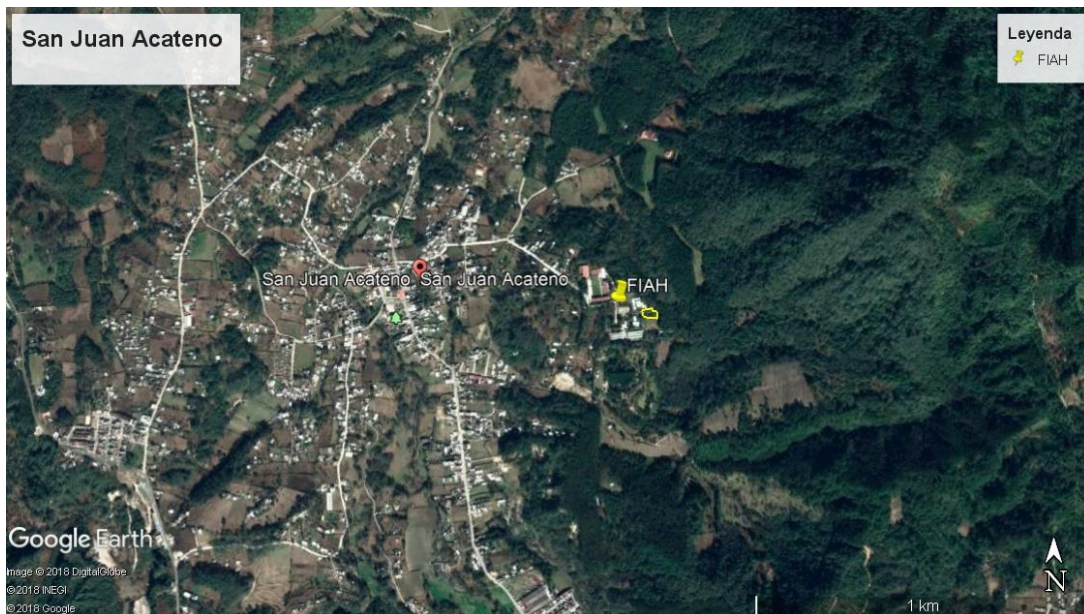


Figura 1. Sitio de establecimiento del experimento. San Juan Acateno, Teziutlán Puebla.

Fuente: Google Earth Pro.

5.2. Material vegetal.

Árboles de aguacate *Hass* de 7 años, injertados en portainjertos criollos de la región, con distancia de plantación de 6 X 6 m.

5.3. Identificación del agente causal

5.3.1 Aislamiento del agente causal del anillamiento del pedúnculo

De los primeros frutos con síntomas se eligieron dos frutos con diferente grado de daño de la enfermedad, y cada uno se corto en trozos del tejido infectado, estos cortes fueron de aproximadamente 1 cm partiendo del punto de unión entre el pedúnculo y la cascara (Figura 2). Estos trozos se colocaron en hipoclorito de sodio al 2 % por 1 minuto, se escurrieron en sanitas secas, posteriormente se colocaron en agua destilada estéril para quitar los restos de cloro y se secaron en sanitas estériles para eliminar el exceso de agua. Todos los trozos fueron manipulados con pinzas estériles y colocados en cajas Petri con medio de cultivo ADS (Agar Dextrosa Sabouraud) (Anexo 2). Las cajas fueron incubadas por 48 horas a 30 °C y después de este tiempo fueron revisadas para observar el crecimiento del hongo u hongos presentes. Para el aislamiento se tomaron con una aguja de disección, parte del crecimiento que salió del tejido colocado sobre el medio, este fue colocado en una caja nueva, e incubado como se describió anteriormente. Todas las cajas fueron etiquetadas con la fecha y el nombre del posible hongo sembrado.

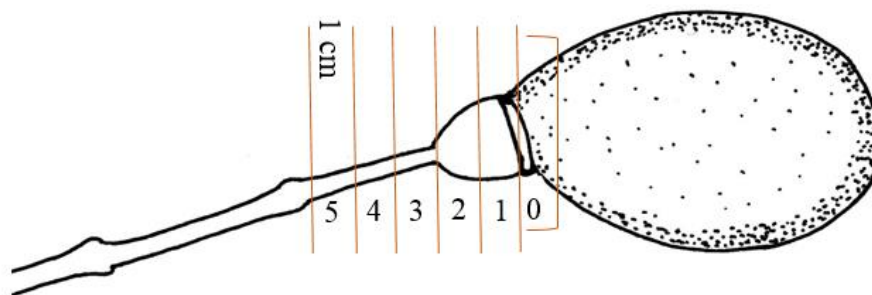


Figura 2. Enumeración de sitios de tejido analizado.

5.3.2. Descripción morfológica y molecular del agente causal del anillamiento del pedúnculo

La descripción morfológica del o los agentes causales del anillamiento del pedúnculo se hizo con base en las claves taxonómicas libro descritas Barnett and Barry B. Hunter (1998), y de acuerdo a éstas, se identificó el género al que pertenece los hongos descritos.

Posteriormente se creció el hongo sobre papel filtro colocado sobre cajas Petri con medio de cultivo ADS (Agar Dextrosa Sabouraud). Estas cajas fueron incubadas por 48 horas a 30° C y después de 5 días con el hongo crecido se procedió a la extracción de ADN para proceder con la extracción molecular.

5.3.2.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se colectó con ayuda de una espátula 2.5 mm³ de micelio crecido sobre el papel filtro. Este micelio se depositó en un micro tubo de 1.5 mL esterilizado previamente, se liofilizó por 8 horas en un equipo de liofilización LABCONCO Freezone de 4,5 litros, para eliminar la humedad y realizar la extracción de ADN. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Quiagen modificado (Anexo 3).

5.3.2.2. Amplificación molecular del ADN extraído

La amplificación del ADN extraído fue hecha para la región ITS del gen 5.8S rRNA con los primers ITS1: 5'-ATTACCGAGTTTCAACTCCC-3' y ITS2: 5'-ACCTGATTCGAGGTCAACGTTC-3' (White *et al.* 1990) los cuales se resuspendieron antes de su uso (Anexo 4). La mezcla utilizada para la amplificación del ADN se hizo de acuerdo al cuadro 4, utilizando las condiciones descritas en el cuadro 5.

Cuadro 4. Mezcla de reacción para amplificación de ADN para la región ITS.

	Cantidad
MgCl₂	25 µL
dNTPs	5 µL
ITS1	30 µL
ITS2	30 µL
Taq	20 µL
Buffer	50 µL
Trealosa	60 µL

DNA	3 μ L
ADN	3 μ L
Volumen total	25 μ L

Cuadro 5. Condiciones utilizadas en la amplificación del ADN para la región ITS.

	Grados	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°	3 min	1
Desnaturalización	94°	30 seg	
Alineación	57°	40 seg	35
Extensión	72°	20 seg	
Extensión final	72°	10 seg	1

Posteriormente a la amplificación del espacio transcripto (ITS) de cada muestra fue secuenciado el producto amplificado por los laboratorios Macrogen en Corea.

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit versión 7.1.9 (Hall, 1999) y el árbol filogenético fue generado con el método Neighbor-joining utilizando el programa Mega versión 3.6 (Tamura *et al.*, 2011).

5.4. Evaluación de daño por el agente causal del anillamiento del pedúnculo en fruto de aguacate (*Persea americana* Mill) dependiendo del estrato, la época de muestreo y la orientación donde se encuentran los frutos.

Para la evaluación del daño de anillamiento en frutos se realizó un muestreo en bloques completos al azar donde los bloques se formaron de acuerdo a la posición donde se encuentra cada árbol. Los muestreos se realizaron en 8 árboles los cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 4 en la periferia y dos en el centro, los árboles muestreados se dividieron en 3 estratos de copa (Figura 3) para tener 12 tratamientos (Cuadro 6). En cada uno de los estratos se tomaron 4 ramas para hacer un total de 12 ramas por árbol, en cada una de estas

se conto el total de frutos enfermos y sanos, cada 8 días se realizó un nuevo conteo con la finalidad de poder observar el comportamiento de la enfermedad en el tiempo con respecto a las condiciones de temperatura y humedad relativa, las cuales se tomaron de la estación meteorológica de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica.

Cuadro 6.Tratamientos

Tratamientos	
T1	Alto Norte (AN)
T2	Alto Sur (AS)
T3	Alto Este (AE)
T4	Alto Oeste (AO)
T5	Medio Norte (MN)
T6	Medio Sur (MS)
T7	Medio Este (ME)
T8	Medio Oeste (MO)
T9	Bajo Norte (BN)
T10	Bajo Sur (BS)
T11	Bajo Este (BE)
T12	Bajo Oeste (BO)

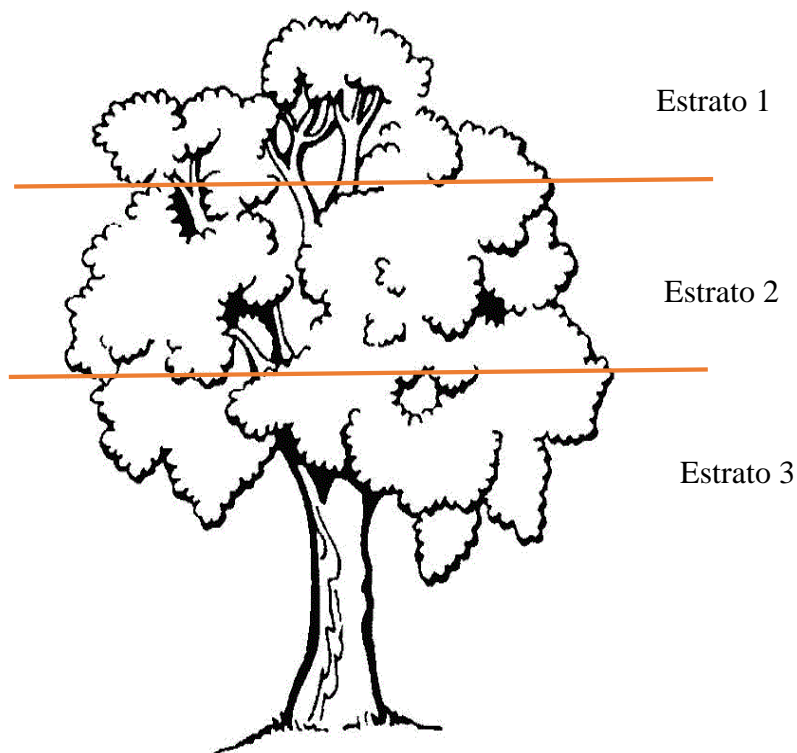


Figura 3. Estratificación del árbol de aguacate muestreado

El estudio se llevó a cabo durante los meses de mayo y junio que es el tiempo donde se ha observado la mayor incidencia de la enfermedad.

5.5. Efecto de la temperatura y precipitación sobre la cantidad de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo.

Para conocer el efecto de la temperatura y precipitación sobre el porcentaje de frutos dañados se tomaron lecturas de estos dos factores climáticos de la estación meteorológica de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica, durante los meses de mayo y junio en los cuales se contaron los frutos dañados por estrato y con diferente orientación (Norte, Sur, Este, Oeste) con la finalidad de determinar cómo afecta la temperatura en el desarrollo del agente causal del anillamiento del pedúnculo del fruto de aguacate (*Persea americana* Mill).

5.6. Análisis de datos y variables a medir en el experimento

Los datos se analizaron en un arreglo factorial 3 x 4 con un diseño en bloques completos al azar con los cuales se formaron 12 tratamientos. Las variables que se midieron en el experimento fueron el daño por anillamiento del pedúnculo dependiendo del estrato y la orientación de copa del árbol de aguacate. Los datos obtenidos como recuento de una distribución de Pirsson fueron transformados con la función $\sqrt{1/X}$ por tratarse de valores heterogéneos (presencia de ceros y valores grandes) obtenidos de las unidades experimentales.

Con estos datos se realizó un análisis de varianza y comparación múltiple de medias eligiendo el mejor tratamiento por medio de la prueba de Tuckey. De igual forma se analizaron los datos con una prueba de correlación lineal obtenidos de la temperatura y precipitación durante la toma de muestras para determinar el efecto que estos dos factores en el desarrollo del anillamiento del pedúnculo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Identificación del agente causal

Se aislaron 10 cepas de dos huertas diferentes de aguacate. En la primera, Cerrito de Guadalupe, Tlatlauquitepec, se aislaron 3 cepas, mientras que en la segunda localizada en la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica se aislaron 7 cepas (Cuadro 7). Se identificó la presencia de la enfermedad independientemente de la variedad *Hass* o criollo y sin importar el sitio de donde se extrajo el corte de tejido de fruto. Los sitios de donde más se aisló el patógeno fue el corte encontrado entre el punto de unión del pedúnculo y la cáscara corte 3 de acuerdo a la Figura 2, y el sitio donde no se aisló el patógeno fue el denominado como 0 encontrado sobre la cáscara.

Cuadro 7. Cepas aisladas dependiendo de la localidad, sitio en el fruto y variedad de aguacate.

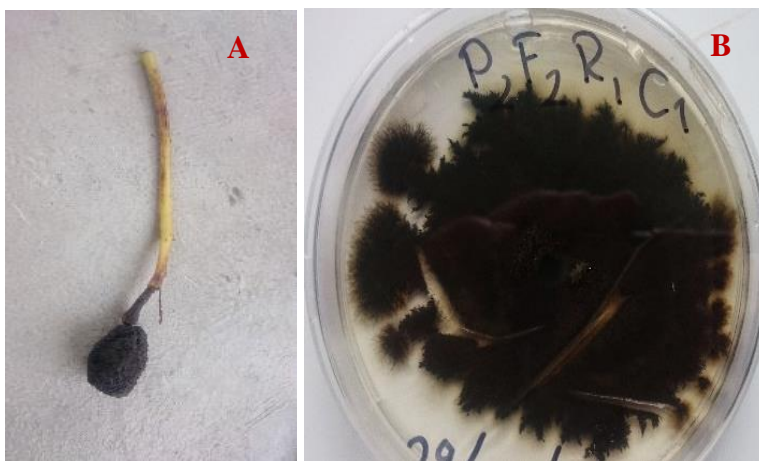
Localidad	Localización	Clave del aislamiento	NCAP
Cerrito de Guadalupe (Tlatlauquitepec)	195221, 972911	P1F2R1C1	1
		P1F2C3	3
		P1F1C4	4
FIAH (Teziutlán)	195224,972141	P2F2R1C3	3
		P2F2R2	2
		P2F2R2C4	4
		P2FCRIOLLO1R2C2	2
		P2F1R1C5	5
		P2FCRIOLLO1R1	1
		P2F1R1C3	3

NCAP; Número correspondiente al corte de donde se aisló el patógeno. FIAH; Facultad de Ingeniería Agrohidráulica.

La falta de aislamiento del patógeno sobre el sitio 0 (sobre la cáscara) se debe a que son sitios más contaminados a diferencia de los demás sitios donde sí se aisló, esto debido a que el avance de la enfermedad es más rápido en este sitio donde las células del epicarpio son más frágiles que las células que componen los tejidos del pedúnculo.

6.1.2. Descripción morfológica y molecular del agente causal

Todas las cepas aisladas de frutos dañados por Anillamiento (Figura 4) se caracterizaron por presentar una tonalidad oscura a negra con micelio liso y crecimiento adherido al medio de cultivo (Figura 4B). La observación morfológica al microscopio de este tipo de micelio mostró estructuras características de esporas denominadas fragmosporas las cuales se observaron con tabiques con 1 a 2 septos (Figura 4Ca y Figura 4Cb), y con 4 septos (Figura 4Da) dichas características concuerdan con las reportadas por Morales y Palomares (1991) quienes observaron esporas con forma de tabiques transversos y longitudinales al identificar al hongo atacando aguacate y causando el anillamiento. El producto amplificado por PCR mostraron bandas con 400 Bp dicho producto al ser secuenciado y comparado con el banco de genes NCBI mostró que la secuencia de ADN tienen el 99 % de identidad con el hongo *Alternaria alternata*. En la Figura 5 se puede ver que los aislados se agruparon con la secuencia de este hongo. *A. alternata* es un microorganismo fitopatógeno típico de árboles frutales, autores como Delgado y Villanueva (2014) lo detectaron atacando aguacate.



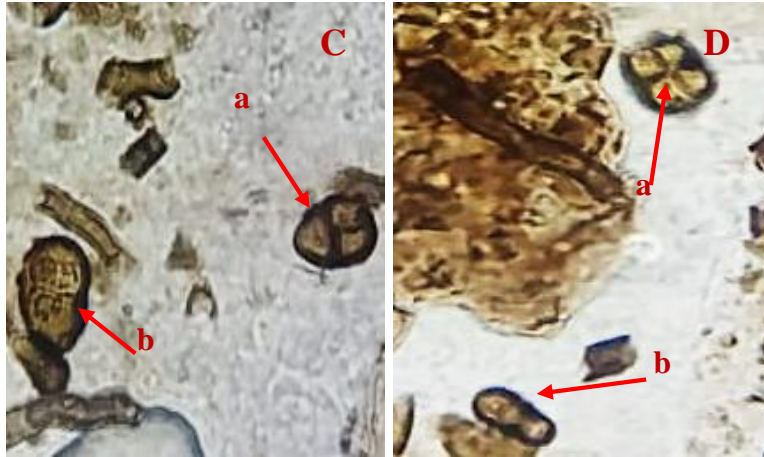


Figura 4. Fruto dañado por anillamiento (A), Aislamiento de *Alternaria alternata* con micelio oscuro crecido sobre papel celofán a 32 °C+/- 2 °C (B). Fragsporas con dos septos trasversos (Ca). Fragsporas con un septo trasverso (Db).

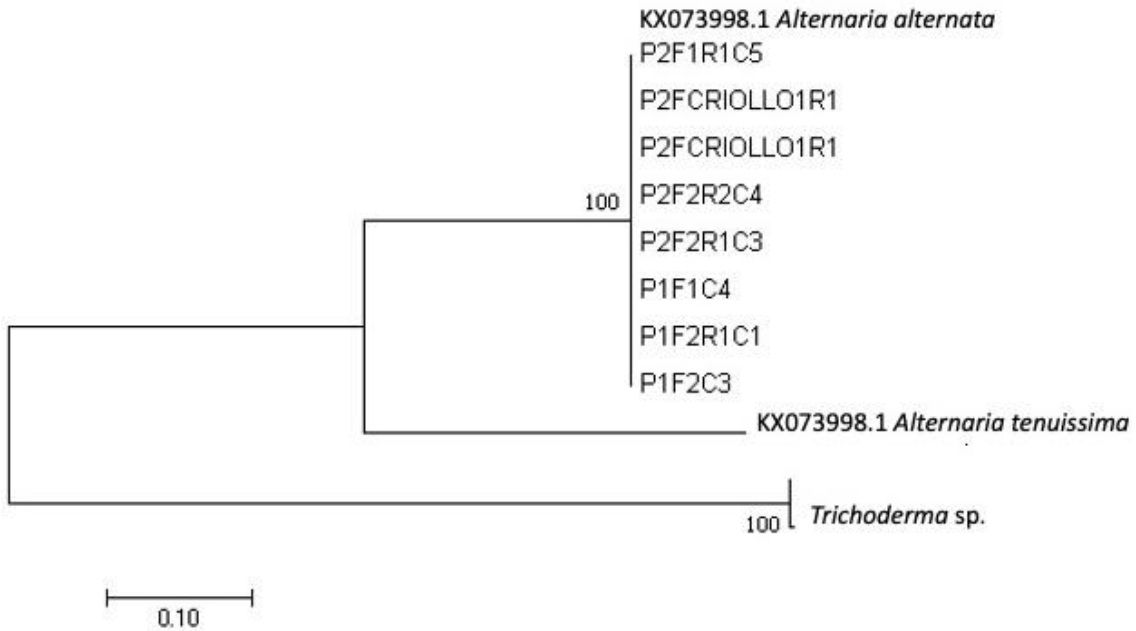


Figura 5. Filogenia de aislados de *Alternaria alternata* inferencia del análisis neighbor joining de los datos de la región ITS, tomando como referencia secuencias de la colección NCBI. Solo se muestran los valores de bootstrap arriba del 80 %.

6.2. Evaluación de daño por el agente causal del anillamiento del pedúnculo en fruto de aguacate (*Persea americana* Mill) dependiendo del estrato, la época de muestreo y la orientación donde se encuentran los frutos.

Datos transformados con la función $\sqrt{1/X}$ del daño evaluado de la huerta de la Facultad de Ingeniería Agrohidráulica localizada en Teziutlán Puebla con los que se realizó el análisis estadístico (Cuadro 8).

Cuadro 8. Datos transformados con la función $\sqrt{1/X}$ obtenidos de observaciones y conteos de frutos enfermos en tres fechas de muestreos del año 2019.

Orientación (Fac B)	Estrato (Fac A)																				Muestreo				
	Alto (1)								Medio (2)								Bajo (3)								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I	II	III	IV		V	VI	VII	VIII
Norte (1)	1	1	1	0.57	0.41	0.7	1	1	1	1	0.57	1	1	1	1	0.5	1	1	1	1	0.7	1	1	1	30 de mayo Muestreo 1 (M1)
Sur (2)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Este (3)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Oeste (4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Norte	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	07 de junio Muestreo 2 (M2)
Sur	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Este	1	1	1	1	1	1	1	1	0.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Oeste	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Norte	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14 de junio Muestreo 3 (M3)
Sur	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Este	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Oeste	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

En el estudio no se observó diferencia significativa entre árboles (Bloques) $F_{(7,18)}=0.2727$, $P < 0.05$, independientemente del estratos; alto, medio y bajo de los 8 árboles muestreados en ningunos de los tres muestreos, y aunque en las ramas muestreadas con orientación **norte** presentaron alta cantidad de frutos (63 %) que mostraron la enfermedad en la primera fecha de muestreo (Figura 6), y en el segundo (25 y 38 %) y tercer muestreo

observa la misma tendencia (25 y 13 %), no se observó diferencia estadística entre estratos en el muestreo uno $F_{(2,18)}= 0.3863$, $P < 0.05$ ni tampoco en los demás muestreos.

Por otra parte a diferencia del muestreo dos y tres donde la orientación norte muestra una mayor presencia de la enfermedad, en el primer muestreo si hubo diferencia estadística significativa entre puntos cardinales u orientación (FACB: Norte, Sur, Este, Oeste) $F_{(3,18)}= 0.0009$, $P < 0.05$. Cuadro 9.

Cuadro 9. Resultados del análisis ANOVA de datos transformados, obtenidos de conteos de frutos enfermos de aguacate en tres fechas de muestreos del año 2019.

Fuente	GL	Cuadrado de la media	Estadístico F	Valor de P
Entre árboles (Bloque)	7	0.0132212	1.28	0.2727
Entre estratos (FACA)	2	0.0099656	0.96	0.3863
Entre puntos cardinales u orientación (FACB)	3	0.0633593	6.12	0.0009
Estratos por orientación (FACA*FACB)	6	0.0089656	0.87	0.5237
Total	18			

Esto sugiere que la orientación juega un papel importante en la incidencia de la enfermedad por anillamiento del pedúnculo, Alcaraz (2012) menciona que hacia el norte existe más humedad que hacia el lado sur, esto podría ser la razón por la que los árboles presentaron un mayor número de frutos dañados hacia el norte. Por otra parte, el análisis estadístico no indicó diferencia entre niveles (Alto, Medio, Bajo) del factor A (Estrato), esto se puede comprobar, al observa presencia de la enfermedad en todos los estratos de todos los muestreos, Antoniazzi y Dáttilo (2016) mencionan que los árboles afectados por alguna enfermedad patógena son dañados en toda su estructura vegetal por consiguiente el anillamiento afecta en cualquier estrato de copa.

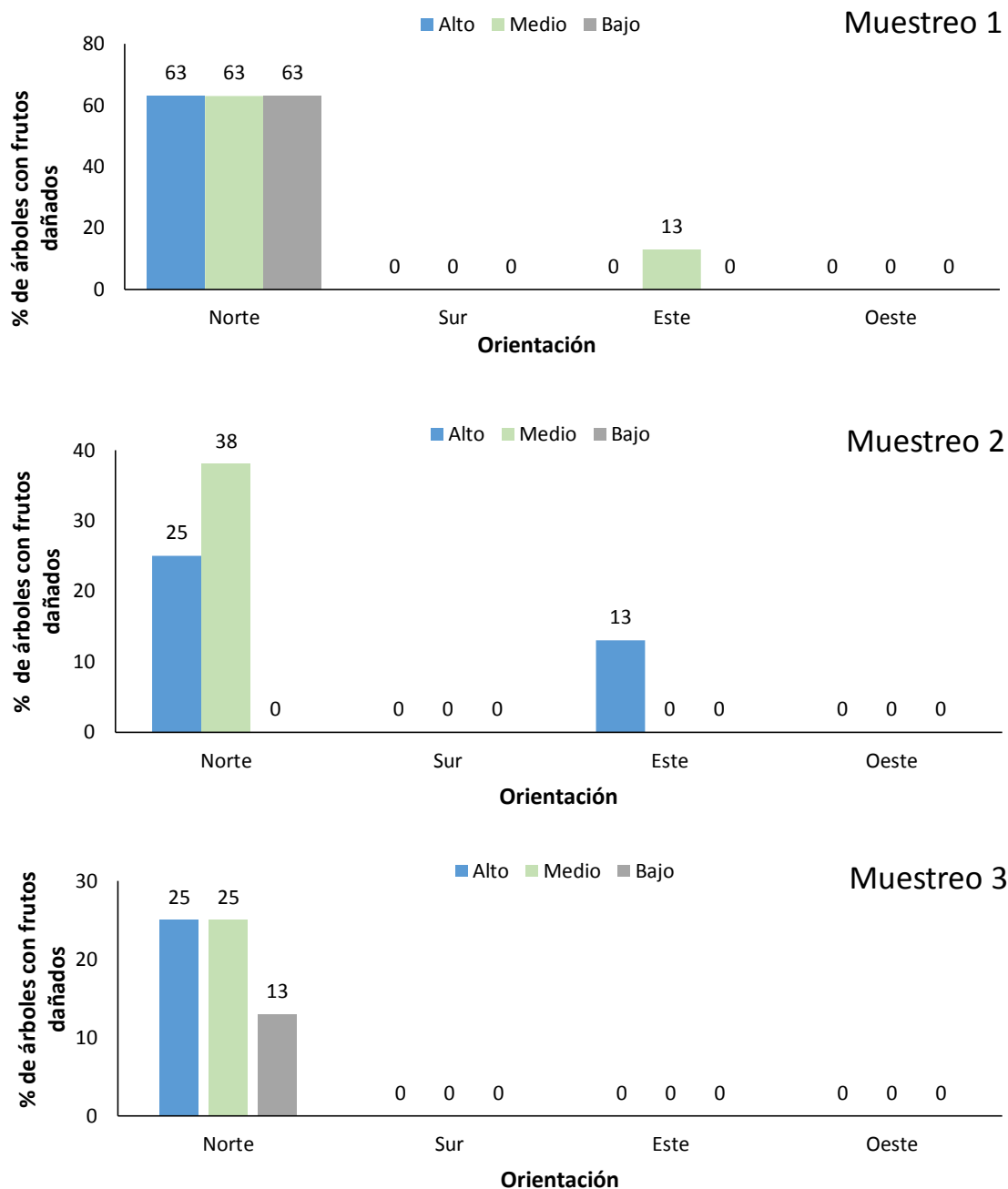


Figura 6. Porcentaje de árboles dañados por anillamiento del pedúnculo muestreado en tres fechas diferentes y con diferente orientación.

Los resultados con la prueba Tukey de la comparación de medias de los tratamientos únicamente del factor B (orientación; Norte, Sur, Este, Oeste) del primer muestreo, el cual mostró diferencia significativa, mostraron que efectivamente el tratamiento (Norte) fue diferente a los demás Cuadro 10, esto indica que la orientación es un factor para que la

enfermedad prospere. La observación directa indica que en el tratamiento Norte se presentó mayor humedad en comparación a los demás tratamientos, por tal motivo en el tratamiento Norte se presento mayor numero de frutos dañados.

Cuadro 10. Diferencias de medias Tukey del factor B (Orientación) analizado como tratamiento en el primer muestreo.

Tratamiento	Frutos dañados por anillamiento
Norte	0.89375 b
Sur	1.00000 a
Este	0.98750 a
Oeste	1.00000 a
Coef. Var	73.46718

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

También se observó que los datos de daño del bloque 8 (Árbol 8) los cuales se tomaron de un árbol criollo también presentó daño.

6.3. Efecto de la temperatura y precipitación sobre la cantidad de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo tomando en cuenta el factor B (Orientación) y como tratamiento la orientación norte de todos los muestreos.

El análisis de correlación entre los resultados de incidencia de anillamiento del pedúnculo y la temperatura media anual, indicaron una ligera dependencia negativa $R^2 = 0.0622$ (Figura 7A), entre la variable X (Época de muestreo) en las cual la temperatura media anual fue de 22.5°C en el primero, 27.5°C en el segundo muestreo y 27.0°C en el tercero, con la variable Y (Incidencia de la enfermedad por anillamiento) la cual fue 63 % en el primer muestreo (30 de mayo), 25 % y 38 % en el segundo (7 de junio) y, 25 y 13 % en el tercero (14 de junio).

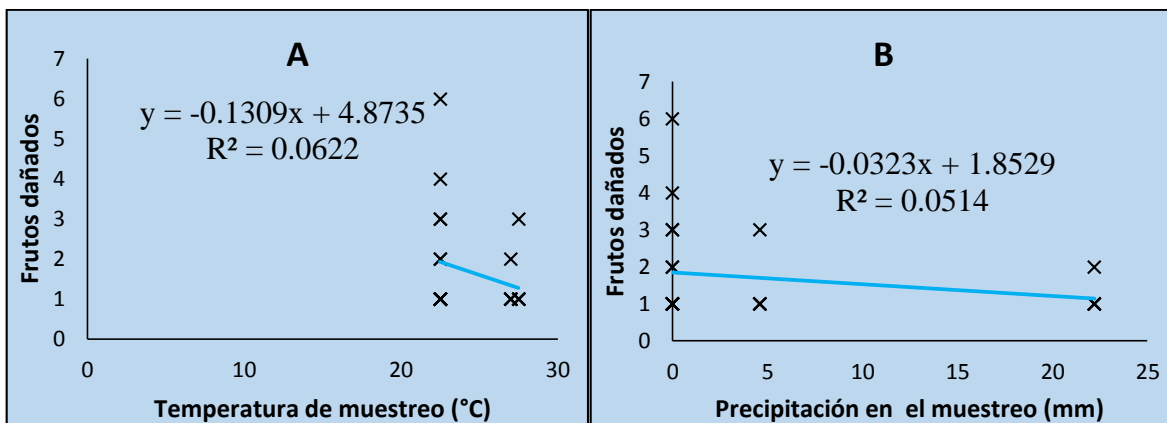


Figura 7. Porcentaje de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo muestreado en tres fechas diferentes y con diferente orientación. Frutos dañados y temperatura de muestreo (A), frutos dañados y precipitación (B).

De igual manera se observa una ligera dependencia negativa $R^2 = 0.0514$ (Figura 7B) con la precipitación la cual fue de 0, 4.6, 22.2 mm en el primero, segundo y tercer muestreo respectivamente. Esto quiere decir que conforme incrementó la temperatura y la precipitación desde el primer hasta el tercer muestreo, fue disminuyendo la cantidad de frutos dañados por anillamiento en las ramas encontradas en la parte norte de la copa, en medio y la parte alta del árbol (Figura 8), esto indica que la enfermedad necesita temperaturas mas frescas que 27 °C y menor precipitación a 22.2 mm para proliferar de manera exitosa.

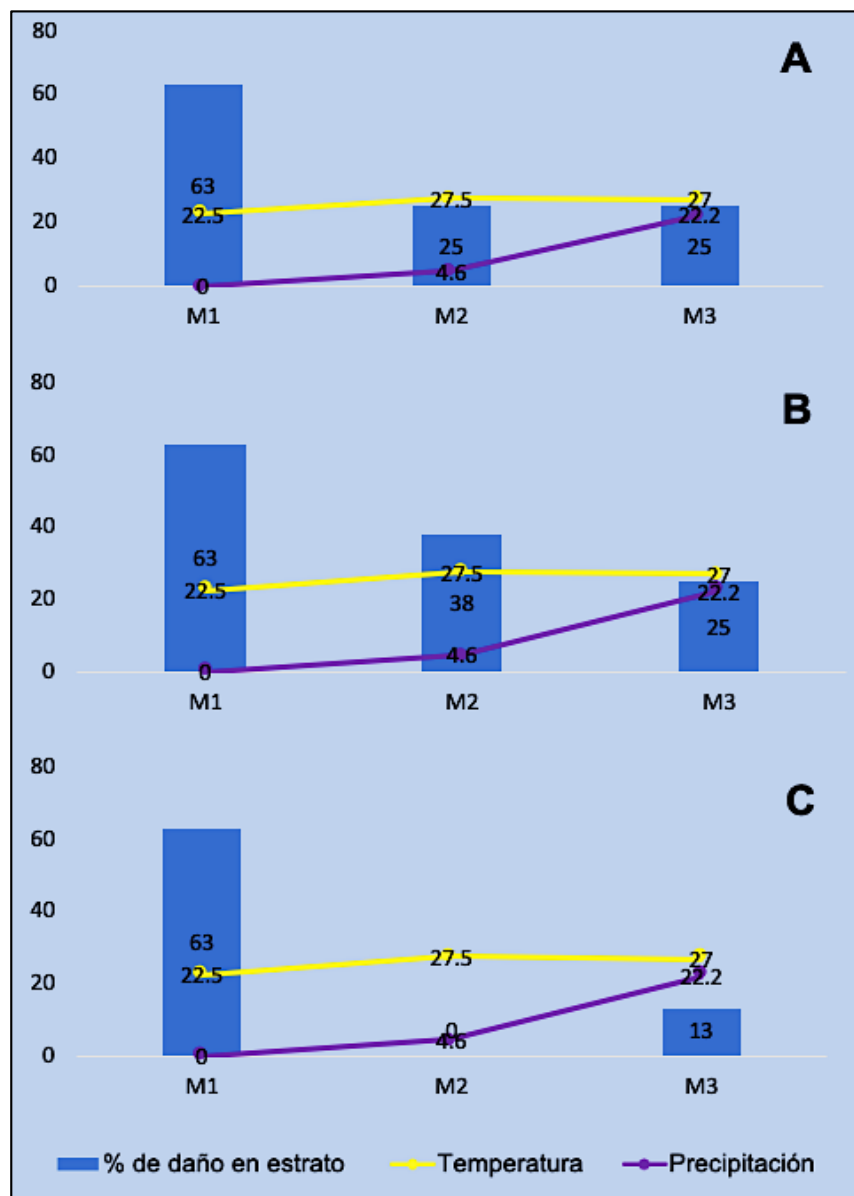


Figura 8. Temperatura, precipitación y porcentaje de frutos dañados por anillamiento del pedúnculo muestreado en tres fechas diferentes en los estratos alto (A), medio (B), y bajo (C).

VII. CONCLUSIÓN

Las características morfológicas indicaron que una de las causas de la enfermedad conocida como anillamiento de pedúnculo es el hongo descrito como *Alternaria alternata* cuya secuencia de ADN a 400 bp se comparó con el banco de genes NCBI y mostró 99 % de identidad con este hongo.

El mayor porcentaje de frutos dañados fue de 63 % y se presentó en el primer muestreo en todos los estratos a diferencia del segundo (25, 38, 0 %) y tercer muestreo (25, 25 y 13 %) que disminuyó.

La parte norte del árbol puede presentar los porcentajes de daños mas altos, debido a que hubo diferencia significativa en esta orientación en el primer muestreo al comparar la cantidad de frutos dañados en los puntos Norte, Sur, Este, Oeste.

El anillamiento del pedúnculo se puede presentar tanto en la variedad *Hass* como en aguacates criollos ya que no se observó diferencia significativa entre árboles muestreados.

En cualquier parte del árbol puede presentarse la enfermedad por anillamiento del pedúnculo ya que el análisis estadístico no indicó diferencia significativa entre niveles (Alto, Medio, Bajo) del factor Estrato.

El anillamiento del pedúnculo tiene menor afectación a temperaturas mayores a 27 °C con precipitación de 22.2 mm, es decir que la enfermedad necesita temperaturas mas frescas que 27 °C y menor precipitación a para proliferar de manera exitosa.

VIII. LITERATURA CITADA

Alcaraz, Francisco Ariza. (2012). Temperatura, luz, atmósfera, viento. Mayo, 2020, Universidad de Murcia
[<https://www.um.es/docencia/geobotanica/ficheros/tema20.pdf>]

Antoniazzi, Reuber y Dattilo Wesley. (2016). Una frontera desconocida: la copa de los árboles. Mayo, 2020, de El Instituto de Ecología (INECOL):
[<https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1050-una-frontera-desconocida-la-copa-de-los-arboles>]

Barnett, Horace Leslie & Barry B. Hunter. (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. EUA: Amer Phytopathological Society.

Bisonó P.A S.MI y Hernandez B.A.J.R. 2008 Guía tecnológica sobre el cultivo del aguacate. Cluster del Aguacate Dominicano. Santo Domingo, D.N. Pp.30-47

Bisonó S. y Hernández J.R (2008). Guía Tecnológica sobre el Cultivo del Aguacate. Santo Domingo D.N pag. 7.

Caballero, A.R.J. 2007. La producción de aguacate en Michoacán. Morelia, Mich.pp. 2-13.

CESAVEG. Comité de Sanidad Vegetal Guanajuato. 2007. Campaña de manejo fitosanitario del aguacatero. México: Comité de Sanidad Vegetal Guanajuato.

Chanderbali, A. S., D. E. Soltis, P. S. Soltis, B. N. Wolstenholme. 2013. Taxonomy and Botany. En: Schaffer, B., B. N. Wolstenholme, A. W. Whiley (eds) The avocado. Botany, production and uses. 2nd edition. CABI, pp. 31-50.

Chanderbali, A. S., V. A. Albert, V. E. Ashworth, M. T. Clegg, R. E. Litz, D. E. Soltis, P. S. Soltis. 2008. *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30: 386-389.

Delgado Vargas Yosgar Agni y Villanueva Betancourt Jesus Salvador. (2012). Identificación y evaluación de la incidencia y severidad del anillamiento del pedúnculo del aguacatero en la Sierra del Tigre, Jalisco. Mayo, 2020, Universidad Autónoma Chapingo, Dep. De Parasitología Agrícola [<https://vdocuments.mx/anillamiento-del-pedunculo-del-aguacatero.html>]

Delgado Vargas Yosgar Agni, Villanueva Betancourt Jesus Salvador. (2014). Identificación y evaluación de la incidencia y severidad del anillamiento del pedúnculo del aguacatero en la sierra del Tigre, Jalisco. Junio 2020, VDokuments [<https://vdocuments.mx/anillamiento-del-pedunculo-del-aguacatero.html>]

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2013). Producción de Aguacate en México. Mayo 2018, FAOSTAT [<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>]

FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016) Producción de aguacate. Mayo 2018, FAOSTAT [<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>]

Galindo-Tovar, M. E., A. M. Arzate-Fernández, N. Ogata-Aguilar, I. Landero-Torres. 2007. The avocado (*Persea americana*, *Lauraceae*) crop in Mesoamerica: 10,000 years of history. *Harvard Papers in Botany*, 12(2), 325-334.

Galindo-Tovar, M. E., N. Ogata-Aguilar, A. M. Arzate-Fernández. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. *Genet Resour Crop Evol*, 55, 441-450.

Gutiérrez-Díez, A., J. Martínez-de la Cerda, E. A. García-Zambrano, L. IrachetaDonjuan, J. D. Morales-Ocampo, I. M. Cerda-Hurtado. 2009. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Rev. Fitotec. Mex.*, 32(1): 9-18.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, (2018). Espacios y datos de México. San Juan Acateno Teziutlán Puebla. Junio, 2018 [http://www.beta.inegi.org.mx/app/mapa/espacioydatos/default.aspx?ag=211740016]

Morales G.J.L 2009 Enfermedades del fruto de aguacate. Fac de Agrobiología UMSNH Michoacan Mexico pp.3-19

Morales Garcia J.L., Palomares Alcala P. (2009). Avocado peduncle collar blight dynamics and severity in Michoacán. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Febrero, 2019. [http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=MX9400174]

Moreno-Limón, S., A. Rocha-Estrada, M. A. Alvarado-Vázquez, M. Salgado-Mora, E. P. Pinson-Rincón. 2010. Aguacate. Variedades, cultivo y producción en Nuevo León. 1° edición. Universidad Autónoma de Nuevo León, pp. 1-148.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Datos superficie de siembra de aguacate en México. Mayo 2018. [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do/]

Téliz, D., A. Mora. 2007. El aguacate y su manejo integrado. 2da edición. Ediciones Mundi-Prensa México, S. A. de C. V., México.

IX. ANEXOS

Anexo 1. ADN

ADN (metasilicato de sodio) (sigma 53514) = 2.1 g disolver en 100 ml de agua destilada estéril, luego agregue otros 94 ml de agua y luego agregue ácido cítrico (sigma c0706). 2 butoxi etanol al etilenglicol butil éter (sigma 531551) esterilizar mediante filtración y mirar a temperatura ambiente). Agitar manualmente.

Anexo 2. Preparación de medio de cultivo agar dextrosa y papa (ADP)

Disolver 39g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, remojar de 10 a 15 minutos, calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos, una vez esterilizado enfriar a unos 40-45°C y vaciar en cajas de Petri.

Anexo 3. Protocolo de Extracción de ADN Quiagen modificada

A este tubo se colocó en un flotador y se sumergió en nitrógeno líquido, se coloca N líquido en los tubos dentro del termo, se sacó el tubo y se maceró la muestra con un micropistilo. Después se mezcla la muestra con 400 µL de Buffer AP1, 4 µL de RNAasa y 6µL de Mercaptoethanol se pasó por el vortex por 30 segundos, posteriormente se pasó al termoblock por un periodo de 10 minutos a 65°. Se agregan 20 µL de proteinasa K, se volvió a colocar en el termoblock 60 minutos a 65°, y se fue agitando por periodos de 15 minutos en el vortex por 60 segundos repartidos en 5, 30 y 15 segundos respectivamente. Se agregó 130 µL de Buffer AP2 y las muestras se colocaron en hielo por 5 minutos, se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos, se pipeteó la mezcla y se colocó en un filtro color lila, se volvió a centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos, se desechó el filtro y se transfirió el fluido a un nuevo tubo y llevar a un volumen de 1.5 con Buffer AP3/E (AW1), se tomó 650 µL de la mezcla y se colocó en el filtro blanco, se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, se descargó el fluido y se colocó nuevamente el filtro, se colocó el resto de la mezcla que se tenía en el tubo con el Buffer AP3/E todo esto se volvió a centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto, posterior a esto se descargó el fluido y se colocó el filtro en un nuevo tubo de 2 ml a

este se agrego 500 μL de Buffer AW2 se centrifugo a 8000 rpm por un minuto, después se transfirió el filtro a un nuevo tubo cuidando que este no tocara el fluido del tubo ya usado, a este nuevo tubo con el filtro se agrego 50 μL de Buffer AE y se incubo por 5 minutos a temperatura ambiente, posterior a esto se centrifugo a 8000 rpm por un minuto, se agrego 50 μL de Buffer AE y se incubo a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugo a velocidad máxima por 1 minuto por ultimo se desecha el filtro y se almaceno a -20°C . Para evaluar la calidad del ADN extraído se utilizo una cámara de electroforesis horizontal marca Thermoscientific, modelo NANODROP 2000c) mediante un gel de agarosa al 1.5% que fue visualizado en un transiluminador (Marca UVP, modelo 3UV-LMS26).

Anexo 4. Resuspensión de Primers

Centrifugar el primer a 8000 rpm por 1 minuto, agregar 369 μL TE al frasco del primer = 100 picomoles, agitar con el vortex por 1 minuto, centrifugar 8000 rpm por 1 minuto y bajar a 10 picomoles, tomar 50 μL de la mezcla, ponerlo en 450 DTE da un total de 500 μL por ultimo hacer 5 alícuotas de 100 μL .

Anexo 5. Anexo 5. Preparación de gel de agarosa 1.5 %

Colocar en un matraz 80 ml de TAE y 1.2 g de Agarosa esto se calienta en microondas hasta que la mezcla sea uniforme y cristalina.