



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

HONGOS ASOCIADOS AL ESCARABAJO AMBROSIAL *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff) (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE) EN ZIRACUARETIRO, MICHOACÁN, MÉXICO

FRANCISCA DE LA CRUZ MARTÍNEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: **Hongos asociados al escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff) (Coleoptera: Scolytidae) en Ziracuaretiro, Michoacán, México,** realizada por la alumna: **Francisca De la Cruz Martínez,** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA


CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)



DR. JESÚS ROMERO NAPOLES

ASESOR (A)



DR. ARMANDO EQUIHUA MARTÍNEZ

ASESOR (A)



DR. JOSÉ ABEL LÓPEZ BUENFIL

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2020.

HONGOS ASOCIADOS AL ESCARABAJO AMBROSIAL *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff) (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE) EN ZIRACUARETIRO, MICHOACÁN, MÉXICO.

**Francisca De la Cruz-Martínez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2020**

RESUMEN

La relación simbiótica entre escarabajos descortezadores y sus hongos asociados ha sido un tema de importancia mundial ampliamente estudiado en áreas forestales; sin embargo, recientemente ha despertado un interés muy especial el estudio de los escarabajos de los géneros *Xyleborus*, *Xylosandrus* y *Euwallacea* y sus hongos ambrosiales; estos escarabajos han desarrollado una estructura especializada similar a un saco (micangio) para la transmisión del simbiote fúngico y la dispersión en árboles hospedantes, también pueden introducir hongos fitopatógenos en ambientes naturales y áreas cultivadas. Tomando en cuenta esta información, los objetivos del presente trabajo fueron tipificar el micangio mesonotal de *Xylosandrus curtulus*, caracterizar molecularmente a la especie, aislar los hongos asociados a este escolítido y verificar la patogenicidad de las cepas mediante los Postulados de Koch, en plantas de aguacate Hass bajo condiciones de invernadero. El estudio se realizó en escarabajos ambrosiales colectados en 2019 en un huerto comercial de aguacate Hass, mediante trapeo con etanol y agua destilada como medio de colecta, en Ziracuaretiro, Michoacán. Los escarabajos se preservaron en agua destilada y bajo condiciones de -5 °C para mantener hidratados los tejidos y áreas membranosas. Se colectaron 76 hembras y la especie se determinó con claves taxonómicas y mediante un análisis molecular que corroboró la identidad de *Xylosandrus curtulus*, además se generó un árbol filogenético que muestra su polifilia, e indica la cercanía con otros géneros de escarabajos ambrosiales de la tribu Xyleborini. El micangio de este escolítido consiste en un par de sacos oblongos, hialinos y membranosos, embebidos en la cavidad del mesotórax y funciona como una estructura de almacenaje de simbiontes fúngicos, los cuales han sido los más estudiados por su impacto en áreas forestales. También se contribuyó con cuatro secuencias de ADN de esta especie de escolítido, debido a que no existen registros de ésta en la base de datos del NCBI Genbank. En el aislamiento de patógenos, se sembraron 40 insectos disectados en cámara húmeda y medio Agar Spezieller Nährstoffarmer; se obtuvieron cepas de *Geosmithia pallida*, *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma asperellum*, *Curvularia lunata*, *Cladosporium anthropophilum* y *Stilbocrea gracilipes*. Se reporta por primera vez a *Geosmithia pallida* como hongo simbiote de *X. curtulus*. De las cepas fúngicas, *Curvularia lunata* se registra por primera vez como patógena en plantas de aguacate Hass. Las pruebas de patogenicidad deben establecerse mínimo durante cuatro meses para el re-aislamiento de las cepas fúngicas ambrosiales en hospederos silvestres y aguacate Hass debido a

su lento crecimiento. El hallazgo de *Citrobacter murlinae*, es un antecedente para estudiar asociaciones de microbiota de escarabajos ambrosiales.

Palabras clave: aguacate, trampeo, agua destilada, sacos, *Geosmithia pallida*, *Curvularia lunata*.

FUNGI ASSOCIATED WITH AMBROSIAL BEETLE *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff) (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE) IN ZIRACUARETIRO, MICHOACÁN, MEXICO.

**Francisca De la Cruz-Martínez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2020**

ABSTRACT

The symbiotic relationship between bark beetles and their associated fungi has been a topic of worldwide importance, widely studied in forest areas; however, recently the study of beetles of the genera *Xyleborus*, *Xylosandrus*, and *Euwallacea* and their ambrosial fungi has aroused a very special interest. These beetles have developed a specialized structure similar to a sack (mycangium) for the transmission of fungal symbiont and posterior dispersion in host trees; they can also introduce phytopathogenic fungi into natural environments and cultivated areas. Taking this information into account, the objectives of this work were to typify the mesonotal mycangium of *Xylosandrus curtulus* and molecular characterization of the species. The study was carried out in ambrosial beetles collected in 2019 in a commercial Hass avocado orchard, by trapping with ethanol and distilled water as a collection medium, in Ziracuaretiro, Michoacán. The beetles were preserved in distilled water and under conditions of -5 ° C to keep the tissues and membrane areas hydrated. In total 76 females were collected and the species was determined with the taxonomic keys and through a molecular analysis, in this way the identity of *Xylosandrus curtulus* was corroborated; in addition a phylogenetic tree was generated that shows its polyphilia, and indicates the proximity with other genera of ambrosial beetles of the Xyleborini tribe. The mycangium of this scolytid consists of a pair of oblong, hyaline and membranous sacs, embedded in the cavity of the mesothorax and functions as a storage structure of fungal symbionts, which have been the most studied for their impact on forest areas. In addition, it was contributed with four DNA sequences of this scolytid species, because there are not records of it in the NCBI Genbank database. In the isolation of pathogens, 40 dissected insects were seeded in a humid chamber and medium Spezieller Nährstoffarmer Agar; strains of *Geosmithia pallida*, *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma asperellum*, *Curvularia lunata*, *Cladosporium anthropophilum*, and *Stilbocrea gracilipes* were obtained. *Geosmithia pallida* is the first reported as a *X. curtulus* symbiote fungus. Of the fungal strains, *Curvularia lunata* is the first recorded as a pathogen in Hass avocado plants. Pathogenicity tests should be established for at least four months for the re-isolation of ambrosial fungal strains in wild hosts and Hass avocado due to their slow growth. The finding of *Citrobacter murlinae* is a background to study microbiota associations of ambrosial beetles.

Key words: avocado, trapping, distilled water, sacks, *Geosmithia pallida*, *Curvularia lunata*.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme concluir esta etapa de mi crecimiento personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría y llevarla a buen fin.

Al Colegio de Postgraduados, campus Montecillo y al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo por el equipo, materiales e instalaciones, donde se realizaron los experimentos.

Al Dr. Jesús Romero Nápoles por su confianza y sus valiosos consejos.

Al Dr. Armando Equihua Martínez por hacerme participe de su vasta experiencia.

Al Dr. José Abel López Buenfil por su colaboración en la investigación.

Al Dr. Gerardo Leyva Mir por su importante apoyo en mi desarrollo profesional.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas por su colaboración y convivencia.

A la Dra. Martha Elva Ramírez Guzmán por sus atinadas aportaciones.

Al Dr. Héctor González Hernández por su valioso apoyo académico y personal.

A la Dra. Leticia Robles Yerena, por compartir sus amplios conocimientos.

Al Sr. Israel Solís Velázquez, propietario del huerto “La Ziranda” por las facilidades brindadas durante las actividades de colecta.

A los colegas de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por las facilidades otorgadas.

A Mariana Calzada y Juan Feroso, colaboradores del Depto. de Parasitología Agrícola, por el apoyo y convivencia durante mi estancia.

A Mariana, Gabriela, María Luisa, Graciela, Martha Alicia, Maribel, Irene, Josefina, Janeth, Verónica, Magdalena, Thalía, Cecilia, Manuel M., Francisco R., Hugo y Manolo, por alentarme en cada uno de mis proyectos personales y profesionales.

A Martha Olivia, Uriel M., Brenda, Verito, Paulina, Gloria Sánchez, Gloria Luna, Carlos Fernando, Silvia, Macrina, Juanito y Claudia, amigos que el Colegio de Postgraduados me permitió descubrir.

Finalmente, a todos los compañeros que omití y que apoyaron incondicionalmente en la conclusión exitosa de este reto académico.

DEDICATORIAS

A mis padres, mis ángeles guardianes y ejemplo de vida.

A Antonio, mi hermano y amigo.

A Juana Luz, Rut Esperanza y Ana Iris, mis queridas sobrinas.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIAS	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	2
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
COLECTA.....	7
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PATÓGENOS	8
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE AISLAMIENTOS DE PATÓGENOS	10
ANÁLISIS MOLECULAR CEPAS DE HONGOS Y BACTERIA	11
POSTULADOS DE KOCH.....	12
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE POSTULADOS DE KOCH	16
ANÁLISIS MOLECULAR ESCARABAJO AMBROSIAL.....	17
TIPIFICACIÓN DEL MICANGIO MESOTORÁCICO	18
V. RESULTADOS.....	19
COLECTA.....	19
SECCIÓN “ESCARABAJO AMBROSIAL”	19
.....	21
SECCIÓN “PATÓGENOS”	22
VI. DISCUSIÓN	33
VII. CONCLUSIONES	38
VIII. LITERATURA CITADA	40
ANEXOS	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Edad de aislamientos para su análisis molecular.	11
Cuadro 2. Registros de las cepas de patógenos en el BLAST.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Trampa colocada en el árbol de aguacate, B) Instalación de la trampa.	8
Figura 2. Orientación de porciones a) Cámara húmeda y b) Medio SNA.....	9
Figura 3. Siembra en SNA.	9
Figura 4. Siembra en cámara húmeda.	9
Figura 5. Cepas inoculadas: T1 (<i>Cladosporium anthropophilum</i>), T2 (<i>Stilbocrea gracilipes</i>), T3 (<i>Curvularia lunata</i> 1), T4 (<i>Curvularia lunata</i> 2), T5 (<i>Geosmithia pallida</i>)	12
Figura 6. Incisiones de 0.5 mm	13
Figura 7. Círculos de medio de cultivo de 0.5 mm	13
Figura 8. Tratamientos por planta y Testigo.....	13
Figura 9. Cortes de partes vegetales necrosadas en T1, T2, T3, T4, T5.	14
Figura 10. Cepas obtenidas del Tratamiento 1.	14
Figura 11. Cepas obtenidas del Tratamiento 2.	15
Figura 12. Cepas obtenidas del Tratamiento 3.	15
Figura 13. Cepas obtenidas del Tratamiento 4.	15
Figura 14. Cepas obtenidas del Tratamiento 5.	16
Figura 15. Siembra de aislamientos con medio con antibiótico.....	16
Figura 16. A) Posición ventral del insecto, B) Eliminación de estructuras, C) Disección del escolítido	19
Figura 17. Tubo de colecta mostrando los especímenes de Scolytidae.....	19
Figura 18. Mechón de setas en la base del protórax y declive elitral característicos de la especie <i>Xylosandrus curtulus</i> (Eichhoff).....	20
Figura 19. A) Vista dorsal y B) vista ventral de <i>X. curtulus</i> (Eichhoff).	20
Figura 20. Árbol filogenético de consenso basado en inferencia bayesiana que ilustra la relación de especies de ambrosiales con respecto a cuatro secuencias (1_query, 2_query, 3_query, 4_query) obtenidas a partir de la amplificación de la región COI de <i>Xylosandrus curtulus</i> . Los números son probabilidades posteriores.....	21
Figura 21. Micangio mesonotal de <i>Xylosandrus curtulus</i> (Eichhoff).....	22

Figura 22. <i>Cladosporium anthropophilum</i> (Sandoval-Denis, Gené & Wiederhold): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri	23
Figura 23. <i>Stilbocrea gracilipes</i> (Tul. & C. Tul.; Samuels & Seifert): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.....	23
Figura 24. <i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn (52p= <i>Curvularia</i> 2): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.....	23
Figura 25. <i>Geosmithia pallida</i> (G. Sm.) M. Kolarík, Kubátová & Paoutová: Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.	24
Figura 26. <i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn (61p = <i>Curvularia</i> 1): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.....	24
Figura 27. <i>Purpureocillium lilacium</i> (Thom.): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.....	24
Figura 28. <i>Trichoderma asperellum</i> Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg (1999): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.	25
Figura 29. <i>Citrobacter murlinae</i> Brenner <i>et al.</i> (1999).	25
Figura 30. Punto de infección 1, tratamiento 1.....	26
Figura 31. Punto de infección 2, tratamiento 1.....	26
Figura 32. Punto de infección 3, tratamiento 1.....	26
Figura 33. Punto de infección 4, tratamiento 1.....	26
Figura 34. Punto de infección 5, tratamiento 1.....	26
Figura 35. Punto de infección 1, tratamiento 2.....	27
Figura 36. Punto de infección 2, tratamiento 2.....	27
Figura 37. Punto de infección 3, tratamiento 2.....	27
Figura 38. Punto de infección 4, tratamiento 2.....	27
Figura 39. Punto de infección 5, tratamiento 2.....	27
Figura 40. Punto de infección 1, tratamiento 3.....	28
Figura 41. Punto de infección 2, tratamiento 3.....	28
Figura 42. Punto de infección 3, tratamiento 3.....	28
Figura 43. Punto de infección 4, tratamiento 3.....	28
Figura 44. Punto de infección 5, tratamiento 3.....	28
Figura 45. Punto de infección 1, tratamiento 4.....	29

Figura 46. Punto de infección 2, tratamiento 4.....	29
Figura 47. Punto de infección 3, tratamiento 4.....	29
Figura 48. Punto de infección 4, tratamiento 4.....	29
Figura 49. Punto de infección 5, tratamiento 4.....	29
Figura 50. Punto de infección 1, tratamiento 5.....	30
Figura 51. Punto de infección 2, tratamiento 5.....	30
Figura 52. Punto de infección 3, tratamiento 5.....	30
Figura 53. Punto de infección 4, tratamiento 5.....	30
Figura 54. Punto de infección 5, tratamiento 5.....	30
Figura 55. Punto de infección 1, Testigo.....	31
Figura 56. Punto de infección 2, Testigo.....	31
Figura 57. Punto de infección 3, Testigo.....	31
Figura 58. Punto de infección 4, Testigo.....	31
Figura 59. Punto de infección 5, Testigo.....	31
Figura 60. Comparación del ancho (A), largo (B) y área (C) del crecimiento de las cepas inoculadas.....	32

I. INTRODUCCIÓN

La relación simbiótica entre escarabajos descortezadores y sus hongos asociados ha sido ampliamente estudiada debido a su importancia mundial en áreas forestales. Sin embargo, recientemente ha despertado un interés muy especial los escarabajos ambrosiales y sus hongos ambrosiales, enfocados principalmente a dos géneros, *Xyleborus* spp. y *Euwallacea* spp. En ese sentido, en la Unión Europea se realizó el estado del arte de los escarabajos ambrosiales del género *Xylosandrus*, por considerarlos un riesgo en viveros forestales y en el comercio de plantas, por esta razón de 2014 a 2017 se incluyeron sitios de inspección en España, Francia e Italia (Vannini *et al.*, 2018); asimismo, en Estados Unidos las investigaciones están enfocadas a tópicos de evolución ecológica, patogenicidad y manejo, incluyendo a *Xylosandrus amputatus* (Blandorf, 1894), *X. compactus* (Eichhoff, 1876), *X. crassiusculus* (Motschulsky, 1866), *X. discolor* (Blandford, 1898) y *X. germanus* (Blandorf, 1894). 1

En México, el escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff, 1869) se encuentra ampliamente distribuido en los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Oaxaca, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Atkinson, 2012).

Lázaro-Dzul (2019) reportó a *Xylosandrus curtulus* Eichhoff, como primer registro para Michoacán de trampas instaladas en huertas de aguacate. Siendo éste el principal estado productor y exportador, con destinos como Estados Unidos de América, Unión Europea, países asiáticos y árabes.

Los escarabajos ambrosiales han desarrollado una estructura especializada similar a un saco (micangio) para la transmisión del simbiote fúngico para la dispersión en árboles hospedantes (Batra, 1963).

El riesgo con estos insectos es que puedan introducir hongos fitopatógenos en ambientes naturales y áreas cultivadas como sucede con *Raffaelea lauricola* asociada a *Xyleborus glabratus* (O'Donnell *et al.*, 2015), ambos amenazando el cultivo de aguacate en la costa este de Estados Unidos de América. Los resultados del estudio del estado del arte, muestran que algunos hongos asociados a *Xylosandrus* spp. son

patogénicos, por ende, si se establecieran en áreas naturales, los daños podrían ser catastróficos (Vannini *et al.*, 2018).

Por otro lado, Li *et al.* (2018) señalan que el clado filogenético *Xylosandrus* presenta cambios en la ubicación morfológica y la plasticidad de los micangios, por lo que es necesario que se realicen trabajos de investigación que permitan esclarecer a nivel de cada especie el papel que juegan los micangios en el transporte de esporas o micelio de hongos ambrosiales, patogénicos o saprófitos; tomando en cuenta esta información, a continuación, se plantean los siguientes objetivos.

II. OBJETIVOS

- Caracterización taxonómica y molecular del escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus* Eichhoff.
- Tipificación de micangio mesonotal en el escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus* Eichhoff.
- Aislar y purificar los hongos asociados al escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus* Eichhoff, colectado éste en un huerto comercial de aguacate en Ziracuaretiro, Michoacán, México.
- Determinar patogenicidad de las cepas aisladas mediante los Postulados de Koch, en plantas de aguacate Hass bajo condiciones de invernadero.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

Atkinson (2012) refiere que dentro de los Scolytinae existe una gran diversidad biológica en cuanto a hábitos alimenticios: fleófagos (descortezadores), xilomicetófagos (ambrosiales), mielófagos (médulas), xilófagos (madera), herbípagos (herbáceas) y espermatófagos (semillas).

En un estudio realizado en el sureste de México, Atkinson y Equihua (1986) concluyen que el grado de especificidad del huésped está relacionado con el hábito de alimentación. También indicaron que la xilomicetofagia es una respuesta a la alta humedad. Por lo tanto, la combinación de calor y humedad alta en los bosques lluviosos tropicales presenta condiciones favorables para el crecimiento de hongos. De

hecho, los Scolytidae y Platypodidae que se han estudiado parecen estar asociados con hongos, incluso especies de fleófagas.

Es probable que en un inicio el hábito ambrosial surgiera en condiciones más favorables para el crecimiento de hongos que para el desarrollo de insectos; la utilización de hongos como fuente primaria de alimento puede haber surgido de la competencia entre escarabajos y microorganismos por el mismo sustrato. El hecho de que la xilomicetofagia haya evolucionado al menos ocho veces separadas de antepasados fleófagos en Scolytidae y Platypodidae apoya esta hipótesis (Atkinson y Equihua, 1986).

Los escarabajos ambrosiales y sus hongos asociados tienen una relación simbiótica mutualista. El hongo se beneficia del escarabajo ya que éste le brinda transporte hacia nuevos hospederos y protección de las condiciones desfavorables, mientras que el escarabajo se beneficia de los nutrientes que proporciona el hongo para su progenie (Batra, 1963).

El bajo grado de especificidad del hospedero de los escarabajos ambrosiales ha sido tema de discusión por varios autores y se debe en gran parte a que estos escarabajos se alimentan de hongos en lugar de tejidos vegetales. Si se supone que los hongos son menos restringidos por el hospedante que los escarabajos, esta asociación simbiótica permite una especificidad menor, pero no es la causa. En cualquier caso, el insecto aún selecciona el hospedante. Parece que el cambio a xilomicetofagia permite una disminución en la especificidad, que luego está determinada por la disponibilidad de recursos (Atkinson y Equihua, 1986).

Los adultos xilomicetófagos establecen sus galerías paternas en el xilema del hospedero, pero no se alimentan de él. Ellos introducen y cultivan hongos ectosimbióticos que transportan en estructuras morfológicas especializadas. Tanto los adultos como las larvas se alimentan del hongo (ambrosia) que crece en las paredes de sus túneles. La gran mayoría de especies de escarabajos establece sus túneles dentro de la albura de ramas y troncos, aunque hay especies que hacen sus túneles en ramitas o tallos de plántulas. En general, los ambrosiales requieren una alta humedad ambiental para su desarrollo y, por lo tanto, son más numerosos en comunidades vegetales o microambientes con mayor precipitación. Su riqueza faunística también

aumenta en las zonas tropicales. Por otra parte, a pesar de unas excepciones notables, no demuestran especificidad respecto a especie de hospedero (Atkinson, 2012).

Wood (1982) indicó que la transmisión de las esporas de sus glóbulos de los hongos simbióticos a su huésped no es un proceso mecánico simple. En muchos casos, las esporas son incapaces de germinar hasta que hayan pasado un período definido de maduración, que puede incluir la proliferación dentro del cuerpo del escarabajo. Como se espera, en cualquier relación mutualista que haya alcanzado este nivel de dependencia existe el desarrollo de estructuras muy especializadas, al respecto los escarabajos han desarrollado inflexiones de la pared del cuerpo en las cuales las glándulas especiales descargan sus secreciones de nutrientes, donde las esporas están protegidas y preservadas.

Six (2003) define, en sentido estricto, al micangio como una invaginación del integumento revestido, con glándulas o células secretoras para la adquisición o transporte de hongos, asimismo establece un esquema para clasificar micangios por función biológica y por su estructura:

1. Con estructura gruesa que transporta hongos; tales como fosas, sacos, y cepillos setales; en los tres casos, con o sin glándulas.
2. Sin estructura que transporta hongos.

En la mayoría de los casos, las hembras adultas son portadoras de micangios y cuando se encuentran en los dos sexos, las estructuras del macho no son funcionales; con excepción de cuando ellos inician la construcción de galerías (Batra, 1963; Six, 2003).

Desde una perspectiva filogenética y taxonómica, el micangio es una estructura funcional importante, ya que se conserva en muchos grupos de Scolytinae, se ubica en diferentes partes del cuerpo y se le puede asociar con la evolución de la alimentación de hongos; es decir, cuenta la historia de la coevolución escarabajo-hongo (Hulcr & Qiao-Zhe, 2013; Wood, 1982).

Los micangios han surgido de forma independiente varias veces en los Scolytidae, subrayando la importancia de los hongos para este grupo de insectos. Aunque el tipo de micangio es a menudo específico del género, la presencia o el tipo de micangio puede variar incluso dentro de un solo género (Six, 2003). Por otro lado, Huang *et al.*

(2018) indican que dentro de Scolytidae y Platypodidae, el cultivo de hongos ambrosiales tiene más de once orígenes evolutivos independientes.

Los hongos ambrosiales son un conjunto ecológico cultivado por los escarabajos ambrosiales como fuente de nutrientes necesarias. Este mutualismo evolucionó en múltiples linajes de escarabajos y hongos. La evolución constante del hábito ambrosial representa una oportunidad única para estudiar patrones y procesos en organismos que pasan de estilos de vida libre e independientes a simbioses mutualistas (Huang *et al.*, 2018). Sin embargo, el estudio de los hongos simbioses se ha realizado en menos del 5% de las especies de escarabajos ambrosiales (Hulcr y Stelinski, 2017).

Usualmente, los escarabajos ambrosiales se asociaban con un único hongo dominante (Batra, 1963). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estas relaciones simbióticas no son necesariamente uno a uno, encontrando que varias especies de hongo pueden cohabitar en los micangios, tal y como lo indica Ángel (2019); este mismo autor refiere que los hongos simbioses son transmitidos verticalmente de una generación a otra dentro de las galerías construidas en el xilema del hospedero; los cuales crecen en las galerías construidas en el xilema del hospedero y son adquiridos mediante la alimentación de las nuevas generaciones. Sin embargo, también puede ocurrir la transferencia horizontal en la cual un hongo simbiote puede ser adquirido por diferentes especies de escarabajos.

Six (2003) señaló que en varias simbiosis se ha encontrado que el insecto asociado depende de los esteroides proporcionados por el hongo. Para el escarabajo ambrosial, *Xyleborus ferrugineus* (Fabricius), requiere la presencia de un hongo asociado en su dieta para la pupación y la oviposición de huevos viables, en tanto que *Xyleborus dispar* (Fabricius) requiere de una especie de hongo relacionada al anterior para el desarrollo de ovocitos, desarrollo larvario y la pupa. Para ambos escarabajos, el ergosterol producido por sus hongos asociados es responsable de estos efectos. También se encontraron resultados similares para *Hypothenemus hampei* (Ferrari), que barrena y se alimenta de cerezas de café, pero no puede mudar o reproducirse sin ergosterol de su hongo simbiótico *Fusarium solani*.

En su mayoría, los hongos ambrosiales pertenecen al Phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina y en menor escala se asocian a levaduras que pertenecen al subphylum Saccharomycotina (Ploetz *et al.*, 2012).

Ángel (2019) menciona que en Pezizomycotina se encuentran tres de los principales órdenes de hongos asociados a escarabajos ambrosiales: Ophiostomatales, donde se encuentra el género *Raffaelea* que es uno de los géneros mayormente asociado a estos insectos; Microascales con el género *Ambrosiella* y los Hipocreales con el género *Geosmithia*. De igual manera, en el sub-phylum Saccharomycotina se han identificado especies en el orden de los Saccharomycetales con los géneros *Pichia*, *Candida* y *Ambrosiozyma*, también asociados a escarabajos ambrosiales.

Li *et al.* (2018) indican que, en la actualidad el modelo para los estudios de la simbiosis ambrosial contempla al género *Xylosandrus*, debido al impacto económico y la alta abundancia de algunas especies, pero también el hecho de que el micangio es accesible y se pueden muestrear fácilmente los hongos. *Xylosandrus* incluye alrededor de 40 especies y pertenece a la tribu más grande de escarabajos ambrosiales, los Xyleborini. *Xylosandrus* y los siguientes cinco géneros: *Anisandrus*, *Cnestus*, *Diuncus*, *Eccoptyterus* y *Hadrodemius*, representan un clado monofilético, caracterizado por el micangio mesotorácico y por asociación muy específica con hongos del género *Ambrosiella*.

Del estado del arte efectuado en la Unión Europea referente a *Xylosandrus compactus*, se reporta a *Ambrosiella xylebori* y *Fusarium solani* como los aislamientos más frecuentes en especies de *Xylosandrus* spp. y otros escarabajos ambrosiales. Así como la interacción novedosa entre *X. compactus* y *Geosmithia pallida*, hongo fitopatógeno exótico e invasor de viveros (Vannini *et al.*, 2018).

De los estudios realizados por Li *et al.* (2018) referente a la variabilidad y ontogenia del micangio de varias especies de *Xylosandrus* (*X. amputatus*, *X. compactus*, *X. crassiusculus*, *X. discolor* y *X. germanus*), en los que se procesaron 181 muestras de escarabajos de Estados Unidos y China, concluyeron que los micangios son órganos dinámicos con cambios morfológicos considerables y variabilidad intraespecífica dependiendo de las fases de la simbiosis y de la especie en cuestión.

Dentro de los micangios, no sólo se albergan hongos, también están presentes bacterias que juegan un papel poco estudiado en el desarrollo y comportamiento del escarabajo (Endoh *et al.* 2008; Six, 2003; Hulcr & Qiao-Zhe, 2012).

Hulcr & Qiao-Zhe (2012) analizaron la diversidad, composición y especificidad de las poblaciones bacterianas en los micangios de *Dendroctonus frontalis*, *Xyleborus affinis*, *Xyleborus bispinatus-ferrugineus*, *Xyleborus glabratus*, *Xylosandrus crassiusculus* y *Xylosandrus germanus*, concluyendo que el micangio de estas especies alberga múltiples bacterias de transmisión vertical tales como Mycoplasmas y probablemente la mayoría de éstas sean comensales, facultativas o parásitos.

Por lo general, las especies de Scolytidae pasan la mayor parte de su ciclo biológico dentro de sus plantas hospederas. Al parecer, el único momento que están fuera de una hospedera es cuando están en camino al próximo hospedero. La mayoría de las especies son diurnas en sus hábitos. Como consecuencia, la mayoría de las especies de esta familia sólo se encuentran por colectores conocedores del grupo (Atkinson, 2012).

Finalmente, a México se le considera como centro de origen del aguacate (Fam. Lauraceae) y es el primer productor mundial con 1,549,000 toneladas, líder en superficie sembrada y exportación de aguacate a nivel mundial (SIAP, 2018). En el panorama nacional, el estado de Michoacán es el mayor productor de aguacate, aporta 79% del total de la producción anual. Le siguen en orden de importancia los estados de México y Jalisco, con 5.9% y 5.5%, respectivamente (SIAP, 2018).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

COLECTA

Se realizó un monitoreo del escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff) del 2 al 8 de junio de 2019, el cual contempló cuatro colectas, en el Huerto “La Ziranda 2”, Ziracuaretiro, Michoacán (1,304 msnm, 19. 2400° N, 101.5456° W). El sitio de colecta tiene una superficie de 3.5 ha, con árboles de aguacate de 10 años de edad y diversos frutales como nance (*Byrsonima crassifolia* L.), ciruelo (*Spondias purpurea*), durazno (*Prunus persica*), mamey (*Pouteria sapota*), cítricos (*Citrus* spp.), café (*Coffea* spp.), mango (*Mangifera indica* L.), papaya (*Carica papaya*) y guayaba (*Psidium guajava*). El clima predominante es cálido subhúmedo con lluvias en verano y humedad media (Lázaro-Dzul, 2019). El trampeo fue con etanol como atrayente específico, técnica que ya había sido utilizada con éxito por Lázaro-Dzul (2019).

En el sitio de estudio se establecieron ocho trampas, que se colocaron a una altura de 1.60 m y distancia aproximada de 40 m (Figura 1). El arreglo de las trampas fue lineal, las primeras dos revisiones fueron diarias y las dos siguientes, cada tercer día.

Las trampas utilizadas fueron similares a las propuestas por Lázaro-Dzul (2019), se elaboraron a base de botellas de PET con capacidad de 2 L, con una abertura lateral de 11 x 10 cm, microtubos de 50 mL con agua destilada como medio de colecta; el atrayente se colocó en la pared interna de la botella en microtubos de 14 mL; el agua destilada se cambió en cada revisión y se sujetaron al árbol con un gancho de alambre.



Figura 1. A) Trampa colocada en el árbol de aguacate, B) Instalación de la trampa.

Los especímenes capturados fueron separados del resto del material y se colocaron en agua destilada en el laboratorio de Micología II de la Facultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Después, en el laboratorio de Taxonomía y Sistemática del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, de la cuarta colecta y última colecta se disectaron 40 especímenes, en dos regiones, la anterior considerando cabeza y protórax con el primer par de patas y la posterior que incluyó mesotórax, metatórax, abdomen y patas correspondientes; en total se obtuvieron 80 porciones para las pruebas de laboratorio.

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PATÓGENOS

En el laboratorio de Micología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, transcurridas 72 horas de la última colecta, se sembraron las 80 porciones señaladas anteriormente, sin ningún proceso de limpieza externa, 40 se sembraron en Cámara Húmeda o Método Freezing Blotter (Warham *et al.*, 1998) y 40 en medio Agar Spezieller Nährstoffarmer; colocando primero cabeza y

luego, abdomen, en el sentido de las manecillas del reloj, en total cuatro porciones (dos individuos) por caja Petri (Figura 2).

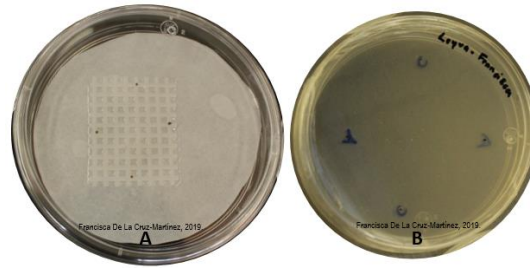


Figura 2. Orientación de porciones a) Cámara húmeda y b) Medio SNA.

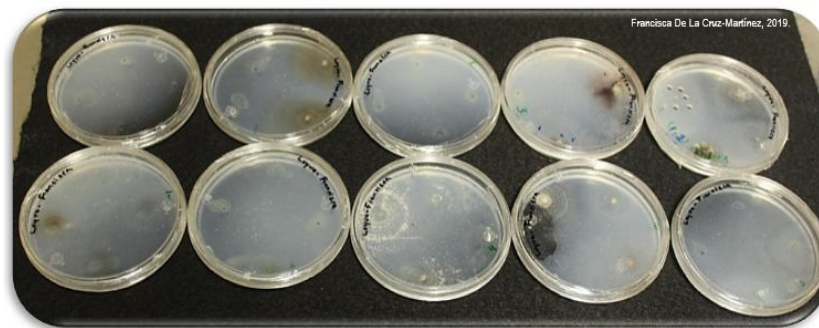


Figura 3. Siembra en SNA.

Para cámara húmeda, las disecciones se depositaron en una rejilla de plástico sobre papel filtro humedecido (Figura 3 y 4). Se mantuvieron bajo condiciones de luz natural y temperaturas que oscilan entre 25 a 27 grados.

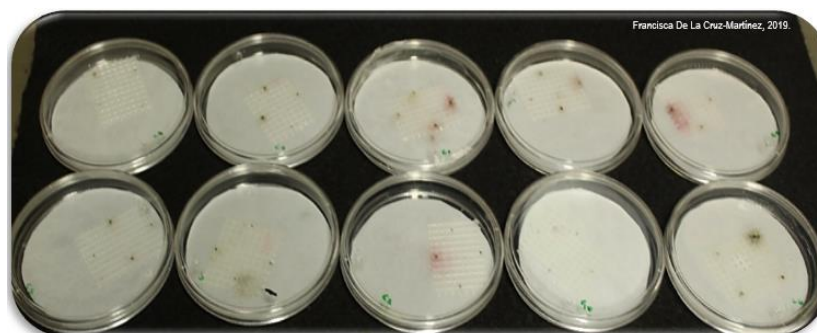


Figura 4. Siembra en cámara húmeda.

Para el aislamiento, purificación e incremento de hongos, se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

I. Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), que se elaboró con 1 g de fosfato monobásico de potasio, 1 g de nitrato de potasio, 0.5 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 0.5 g de cloruro de potasio, 0.2 g de glucosa, 0.2 g de sacarosa

mezclados en 1 L de agua destilada, en autoclave a 120 lb de presión durante 15 minutos para su esterilización.

II.- Papa Dextrosa Agar (PDA), medio semi sintético; para su preparación se pesaron 100 gramos de papa natural, 7.5 gramos de dextrosa y 10 gramos de agar; primero se coció la papa con agua en autoclave, una vez alcanzada 120 lb de presión se mantuvo a ese nivel durante 15 minutos; se dejó enfriar y se agregó dextrosa y agar, esta mezcla se sometió a otros 15 minutos de presión en autoclave.

III. Papa Dextrosa Agar con antibiótico, medio semi sintético; se preparó como el medio anterior, y previo al vaciado en las cajas Petri, se agregaron 200 mg de Streptomina y 200 μ L de ácido láctico por litro, agitándose vigorosamente previo al vaciado de la mezcla.

IV. Papa Dextrosa Agar **BDBioxon®**, medio sintético; se pesaron 40 g de la formulación del producto por 1L y se colocó a 120 lb de presión en autoclave durante 15 minutos.

En ese sentido, aproximadamente al quinto día de sembrado, se aisló y purificó la bacteria en medio Papa Dextrosa Agar **BDBioxon®** con asa bacteriológica. Para el caso de los hongos, al noveno día utilizando punta de hifa, cultivos monospóricos, así como Sacabocados® de 0.5 mm para su incremento, en los cultivos antes citados.

La preservación de las cepas de los hongos se realizó mediante la técnica “pico de flauta”; en la cual los tubos de ensaye contenían medio de cultivo PDA, se colocaron círculos de 0.5 mm con crecimiento miceliar de cada cepa, se mantuvieron a temperaturas de 25 a 27°C y una vez que llenaron la superficie del medio, se cubrieron con aceite mineral esterilizado durante cuatro horas y clarificado por cuatro semanas, de esta manera se conservaron en refrigeración.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE AISLAMIENTOS DE PATÓGENOS

Con objeto de identificar diferencias significativas entre medios de cultivo, regiones e interacción entre éstos, se aplicó el Modelo Lineal Generalizado, con 2 distribuciones, la primera para suma total de patógenos se utilizó la distribución Poisson con función liga Logaritmo y la segunda para ausencia o presencia de cada patógeno se utilizó la distribución Binomial con función liga Logit y se utilizó el programa R version 2.6.2. Las hipótesis que se evaluarán fueron:

- 1) Ho = No existen diferencias significativas entre Medios de cultivo
Ha = Existen diferencias significativas entre Medios de cultivo
- 2) Ho = No existen diferencias significativas entre Regiones del cuerpo del insecto.
Ha = Existen diferencias significativas entre Regiones del cuerpo del insecto.
- 3) Ho = No existen diferencias significativas entre la interacción entre Medios y Regiones del cuerpo del insecto.
Ha = Existen diferencias significativas entre la interacción entre Medios y Regiones del cuerpo del insecto.

ANÁLISIS MOLECULAR CEPAS DE HONGOS Y BACTERIA

Con respecto al análisis molecular de las cepas de hongos y la bacteria, sembradas en PDA, en el Cuadro 1 se muestra la edad a la que fueron procesadas.

Cuadro 1. Edad de aislamientos para su análisis molecular.

Cepa	Fecha de siembra	Edad
Cladosporium	19/07/2019	7 semanas
Stilbocrea	19/07/2019	7 semanas
Curvularia 1	26/07/2019	6 semanas
Curvularia 2	26/07/2019	6 semanas
Geosmithia	19/07/2019	7 semanas
Purpoleocillium	19/07/2019	7 semanas
Trichoderma	01/09/2019	2 días
Citrobacter	25/06/2019	6 días

Para la extracción de DNA de los aislamientos, tanto de hongos como la bacteria, se realizó por el Método Doyle & Doyle (1990), en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario del Colegio de Postgraduados (LADIFIT-COLPOS). Este laboratorio actualmente cuenta con un respaldo de los aislamientos.

En el caso de las cepas fúngicas, la amplificación de la región rDNA se efectuó con los oligos ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS 5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

Las amplificaciones de PCR se realizaron con un termociclador T100 de la marca Biorad, bajo las condiciones siguientes: un ciclo de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95° por 45 segundos, 57°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, una extensión final de

72°C por 5 minutos (White, *et al.*, 1990). Las amplificaciones de las cepas fúngicas se enviaron a Macrogen Corp. (USA) para su secuenciación.

Para la cepa bacteriana, se amplificó la región 16S del rDNA con los oligos universales 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCA) y 1492R (AAGGAGGTGATCCAGCC). El programa de amplificación fue de 94°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos 94°C por 1 minuto, 58°C por 45 segundos, 72°C por un minuto y una extensión final de 72°C por 8 minutos. Esta muestra se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM en el estado de Morelos.

POSTULADOS DE KOCH

Referente a los Postulados de Koch, el 11 de julio de 2019 se efectuó una inoculación de cinco aislados fúngicos, mismos que se usaron como tratamientos y se designó un testigo para la prueba; para la inoculación se utilizaron plantas de aguacate Hass injertadas en aguacate mexicano, menores de un año de edad. Se decidió utilizar este tipo de árbol, ya que es el cultivar predominante en el huerto La Ziranda 2; las plantas inoculadas inicialmente se establecieron en el Invernadero de Virus Fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola, UACH bajo condiciones de luz natural y rango de temperaturas entre 23 y 28°C (Figura 5).

Cada planta fue inoculada con cinco círculos de medio de cultivo PDA de 0.5 mm de diámetro de cada aislamiento fúngico, los cuales fueron “puntos de infección”; en tallos y ramas se realizaron incisiones con un Sacabocados de 0.5 mm, simulando mordidas del escarabajo, una vez colocados los círculos se protegieron con parafilm y cada tercer día se efectuaron riegos; para el caso del testigo se realizó el mismo procedimiento, con círculos de medio, pero sin hongo (Figuras 6-8).

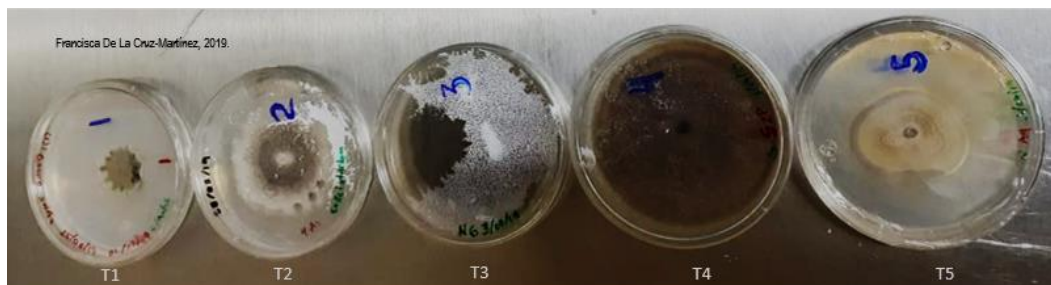


Figura 5. Cepas inoculadas: T1 (*Cladosporium anthropophilum*), T2 (*Stilbocrea gracilipes*), T3 (*Curvularia lunata* 1), T4 (*Curvularia lunata* 2), T5 (*Geosmithia pallida*)



Figura 6. Incisiones de 0.5 mm



Figura 7. Círculos de medio de cultivo de 0.5 mm

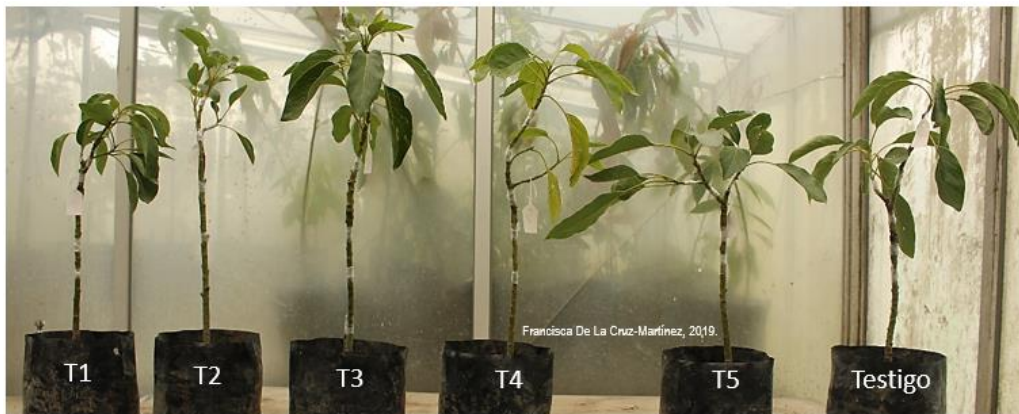


Figura 8. Tratamientos por planta y Testigo.

Después de siete días, las plantas se trasladaron a la Cámara Bioclimática del Campo Experimental Valle de México adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), sita en km 13.5 de la Carretera Los Reyes- Texcoco, Coatlínchán, Texcoco, Estado de México, C.P. 56250. Esta cámara contó con dos controladores, uno de humedad y otro de luz; el ambiente se mantuvo a punto de rocío, doce horas luz y doce horas oscuridad.

Transcurridos once días, las plantas se regresaron al invernadero de Virus Fitopatógenos y de los puntos de infección, se cortaron las partes vegetales necrosadas tanto de tallos, ramas y tejido circundante aparentemente sano.



Figura 9. Cortes de partes vegetales necrosadas en T1, T2, T3, T4, T5.

Al término de esta actividad, los puntos de infección se cubrieron con parafilm y quedaron bajo observación durante cuatro meses, desde el 11 de julio hasta 12 de noviembre de 2019, bajo condiciones de 20 a 30 % de humedad relativa, condiciones de luz natural y rango de temperaturas entre 23 y 27°C (Figura 9).

Luego en el laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, se sembraron cuatro cuadros del material disectado, de 0.4 por 0.4 mm de tamaño, sin ningún proceso de desinfestación por caja Petri con PDA, con tres repeticiones por tratamiento, incubándose a 30°C por 72 horas (Figuras 10-14).



Figura 10. Cepas obtenidas del Tratamiento 1.

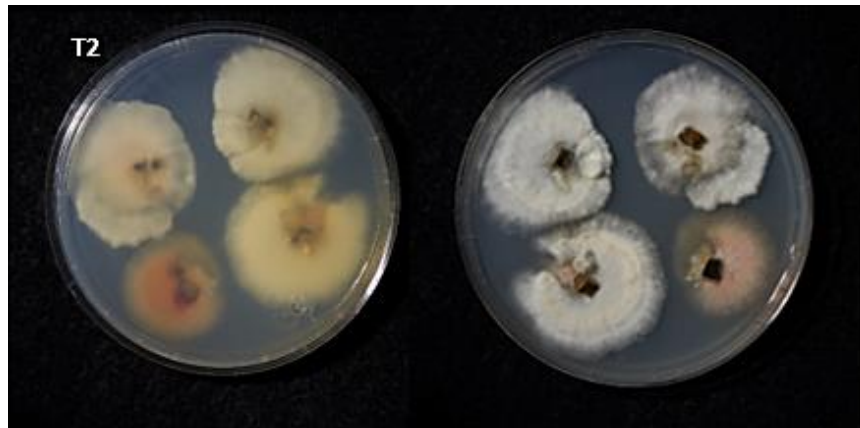


Figura 11. Cepas obtenidas del Tratamiento 2.



Figura 12. Cepas obtenidas del Tratamiento 3.

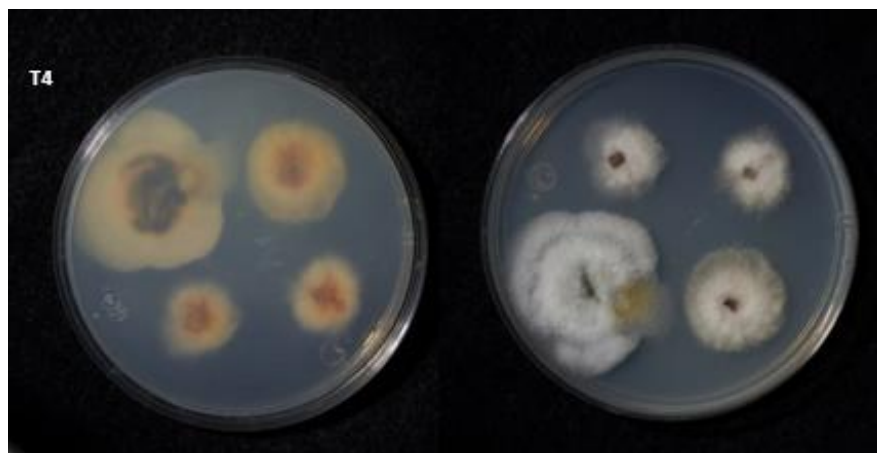


Figura 13. Cepas obtenidas del Tratamiento 4.



Figura 14. Cepas obtenidas del Tratamiento 5.

A continuación, los tratamientos se resembraron, mediante círculos de 0.5 mm de diámetro en contenedores con PDA y antibiótico, para evitar crecimiento bacteriano, manteniéndose a 30°C y una vez transcurridas 72 horas, se efectuó la corroboración del aislamiento de cepas (Figura 15).



Figura 15. Siembra de aislamientos con medio con antibiótico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE POSTULADOS DE KOCH

Transcurridos cuatro meses y considerando la incidencia del 100% de los cinco tratamientos (cepas fúngicas) en los puntos de infección, en relación con los puntos del testigo, se procedió a tomar medidas de largo y ancho del crecimiento de cada punto (Anexo 1).

Para evaluar la patogenicidad se realizó un Modelo Lineal Generalizado, con distribución Poisson con función liga Logaritmo, en el programa SAS Version 9.4. Posteriormente, para aquellos factores con significancia estadística ($P > 0.05$) se realizó una prueba LSD.

ANÁLISIS MOLECULAR ESCARABAJO AMBROSIAL

Con respecto al análisis molecular del escarabajo ambrosial, se seleccionaron cuatro ejemplares, dos conservados en agua destilada y dos en alcohol al 70%, en lo subsecuente se identificarán éstos como muestra A (1 y 2) y muestra B (3 y 4). La extracción de DNA se realizó por el Método del CTAB - Bromuro de cetiltrimetilamonio (Doyle & Doyle, 1987) en el laboratorio de Evolución Molecular del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo.

La región Citocromo C Oxidasa, subunidad I (CO-I) se amplificó con los marcadores LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'), conforme a las subunidades moleculares del ADN mitocondrial "mtDNA" (Protocolo de diagnóstico Amplificación de la región mtDNA CO-I, para la identificación de insectos por PCR punto final LC01490/HCO2198-SENASICA, 2017).

Las amplificaciones de PCR se realizaron con un termociclador T100 de la marca Biorad bajo las condiciones siguientes: 94 °C por 60 s, 4 ciclos a 94 °C por 30 s, 45 °C por 90 s y 72 °C por 60 s, seguidos por 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 51 °C por 90 s y 72 °C por 60 s, finalizando con una extensión a 72 °C por 5 min. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 2.0 % con bromuro de etidio (10 mg/uL) (Sambrook & Russell, 2001) y se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV GELDOC EZ, marca Bio Rad®, utilizando el software Image Lab (Biorad®).

La ampliación obtenida con los iniciadores LCO1490/HCO se purificó (ExoSAP-IT) y se secuenció (Genetic Analyzer 3100, Applied Biosystem Corp®). Las secuencias del COI obtenidas se compararon con las de referencia del GenBank, usando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center of Biotechnology Information (NCBI).

El producto de PCR de la muestra 4B se clonó utilizando pGEM® T Easy Vector de Promega. El plásmido portador del fragmento se utilizó para transformar las células competentes One Shot® Mach1™ T1R *E. coli* de Invitrogen. Se seleccionaron las colonias bacterianas que lograron introducir el plásmido y se realizó extracción de ADN con el método de lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001). A continuación, el DNA clonado se amplificó por PCR y se secuenció en ambos sentidos con el equipo ABI PRISM 3130 de Applied Biosystems® mediante la química BigDye™ Terminator v3.1.

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR se limpiaron y ensamblaron en el módulo SeqMan Pro del programa DNASTAR Lasergene Molecular Biology 16. Posteriormente, cada uno de los ensamblados se sometieron a un análisis de homología BLAST contra la base de datos de nucleótidos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se generó una base de datos con secuencias de referencia obtenidas de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en base a los resultados del análisis de homología, todas las secuencias descargadas correspondieron a amplificaciones del gen Citocromo C Oxidasa, subunidad I.

Para el análisis filogenético se incluyeron los ensamblados obtenidos a partir de la secuenciación de los ejemplares de las colectas y las bases de datos de referencia resultado de la búsqueda en el Gen Bank. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL OMEGA 1.2.2 (Sievers y Higgins, 2014) y la búsqueda del mejor modelo de sustitución de nucleótidos con ModelTest-NG (Darriba *et al.*, 2019). Finalmente, la reconstrucción filogenética se realizó con Inferencia bayesiana mediante Markov Chains Monte Carlo (MCMC), implementado en el programa BEAST v1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) con 1,000,000 de generaciones. Para la anotación del mejor árbol, se descartó el 25% de los árboles producidos y la probabilidad posterior se determinó con los árboles restantes, la edición final del árbol se realizó en FigTree. Se utilizó como grupo de partida (outgroup) la secuencia KU911862.1 del GenBank correspondiente a la región del Citocromo C Oxidasa, subunidad I del escarabajo *Chrysomela tremula*.

TIPIFICACIÓN DEL MICANGIO MESOTORÁCICO

Con respecto a la tipificación del micangio de *Xylosandrus curtulus*, se tomaron 8 especímenes almacenados bajo condiciones de -5 °C, se procedió a descongelarlos, uno por uno, durante 5 minutos y mediante disección manual, con pinzas entomológicas no. 5 y pincel no. 000, utilizando agua o glicerina como medio de disección, se eliminaron las partes del cuerpo, quedando sólo la parte dorsal del mesotórax; de manera cuidadosa se eliminó la parte ventral y se limpió con agua destilada o glicerina (Figura 16).

Esta última también se empleó para preservar las disecciones en microviales. Posteriormente, se procedió a colocar el mesotórax en posición ventral, en portaobjetos con glicerina para su observación en microscopio compuesto.



Figura 16. A) Posición ventral del insecto, B) Eliminación de estructuras, C) Disección del escoltído

V. RESULTADOS

COLECTA

Referente a la colecta del escoltído en las trampas repartidas en el huerto, se logró coleccionar un total de 76 especímenes (Figura 17) de *Xylosandrus curtulus*. Es importante indicar que en las trampas también se registraron otras especies de Scolytidae, mismo que se guardaron para otros estudios posteriores.



Figura 17. Tubo de colecta mostrando los especímenes de Scolytidae.

SECCIÓN “ESCARABAJO AMBROSIAL”

Identificación del escarabajo ambrosial. Respecto a la identificación de la especie de Scolytidae se utilizaron las claves de Wood (1982) y por comparación con material

determinado de la especie en la Colección de Insectos del Colegio de Postgraduados (CEAM), ésta se identificó como *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff, 1869) (Figura 18 y 19).



Figura 18. Mechón de setas en la base del protórax y declive elitral característicos de la especie *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff).

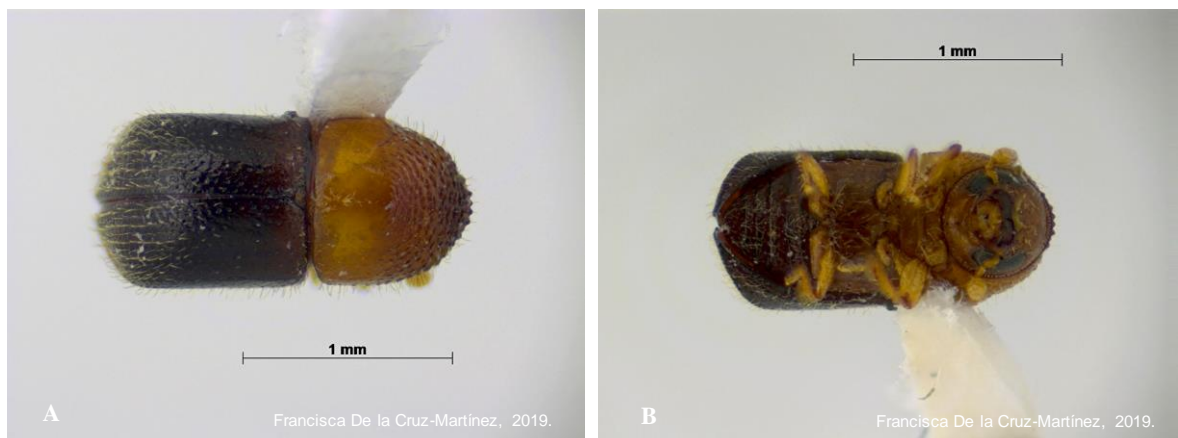


Figura 19. A) Vista dorsal y B) vista ventral de *X. curtulus* (Eichhoff).

Caracterización molecular. Los resultados de homología del BLAST arrojaron que las cuatro secuencias obtenidas de *X. curtulus* no se encontraban en las bases de datos de la NCBI; sin embargo, este escolítido está estrechamente relacionado con otros escarabajos ambrosiales, que forman clados heterogéneos a nivel genérico, por lo que el CO-I no fue un buen marcador para su identificación (Figura 20).

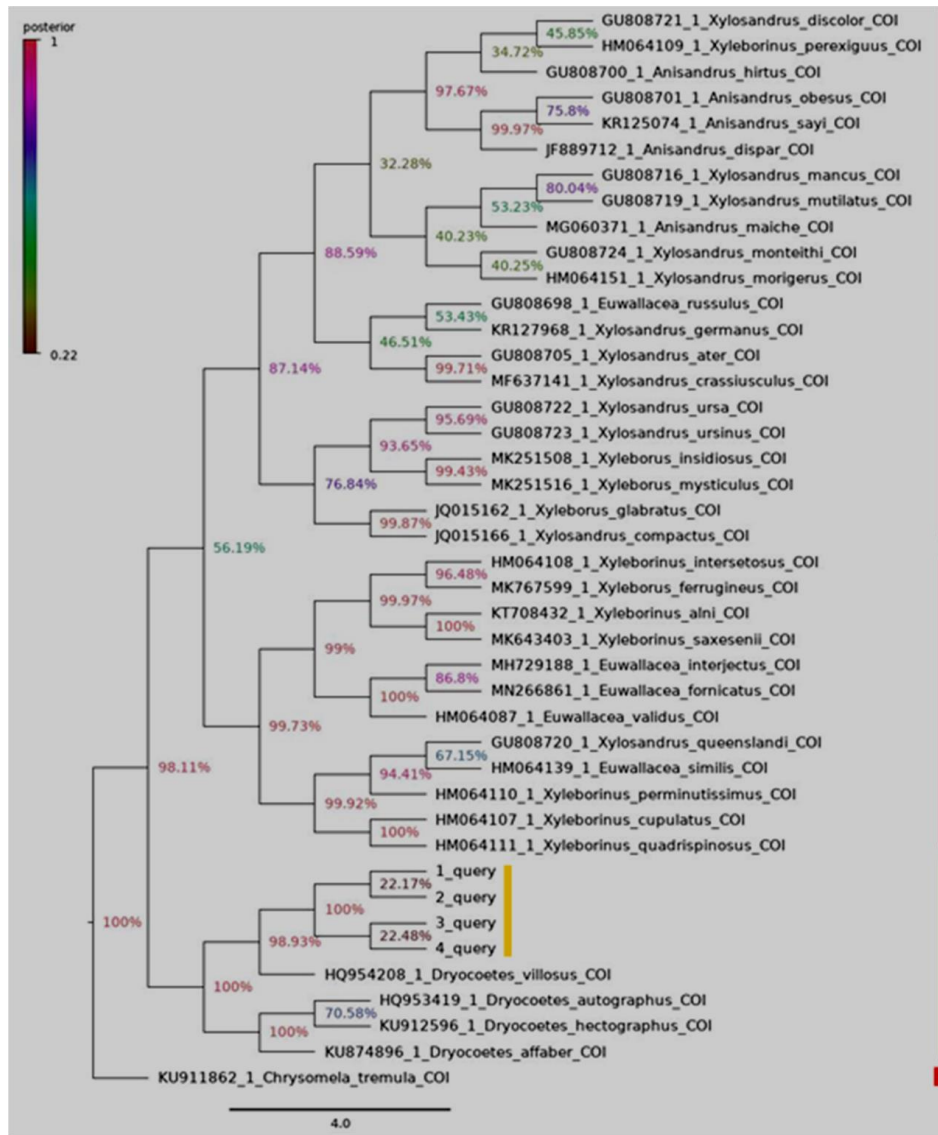


Figura 20. Árbol filogenético de consenso basado en inferencia bayesiana que ilustra la relación de especies de ambrosiales con respecto a cuatro secuencias (1_query, 2_query, 3_query, 4_query) obtenidas a partir de la amplificación de la región COI de *Xylosandrus curtulus*. Los números son probabilidades posteriores.

Tipificación del micangio mesonotal. Se logró aislar el micangio de *Xylosandrus curtulus* y éste se puede caracterizar como un par de sacos oblongos, hialinos y membranosos, con medidas de 0.19 mm de largo por 0.19 de ancho, embebidos en la cavidad del mesotórax y adheridos a éste por un extremo (Figura 21).



Figura 21. Micangio mesonotal de *Xylosandrus curtulus* (Eichhoff).

SECCIÓN “PATÓGENOS”

Como resultado de las 80 porciones sembradas (40 en Cámara Húmeda y 40 en SNA), se encontraron, siete cepas fúngicas y una bacteriana, que se clasifican en cinco grupos de patógenos: a) hongo simbiote, b) hongos patogénicos, c) hongo entomopatígeno, d) hongo antagonico y d) bacteria endosimbiótica.

De la aplicación del Modelo Lineal Generalizado se encontró que no existen diferencias significativas de los medios de cultivo, las regiones del insecto y la interacción entre ambos.

Referente al análisis molecular realizado a las cepas de bacterias y hongos purificadas, se enlistan éstos en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Registros de las cepas de patógenos en el BLAST.

Cepas	Max score	Total score	Query cover	E value	Per Ident	Accession
<i>Cladosporium anthropophilum</i>	896	896	100%	0	99.80P%	MN412639.1
<i>Stilbocrea gracillipes</i>	1020	1020	94%	0	98.61%	MN497407.1
<i>Curvularia lunata</i>	920	920	100%	0	99.60%	MK532912.1
<i>Curvularia lunata</i>	935	935	99%	0	99.42%	MK532912.1
<i>Geosmithia pallida</i>	1103	1103	99%	0	99.83%	MH426792.1
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	143	143	100%	8.00E-31	100.00%	MN634677.1
<i>Trichoderma asperellum</i>	785	785	99%	0	88.65%	KF815050.1
<i>Citrobacter murlinae</i>	1925	1925	99%	0	97.14%	HQ407238.1

Las secuencias obtenidas se compararon con el banco de datos del BLAST, obteniendo similitudes arriba del 88.65%, como se observa en el cuadro anterior (Anexo 2 Secuencias genómicas de cepas). Las cepas aisladas de *X. curtulus* se ilustran en las Figuras 22-29.

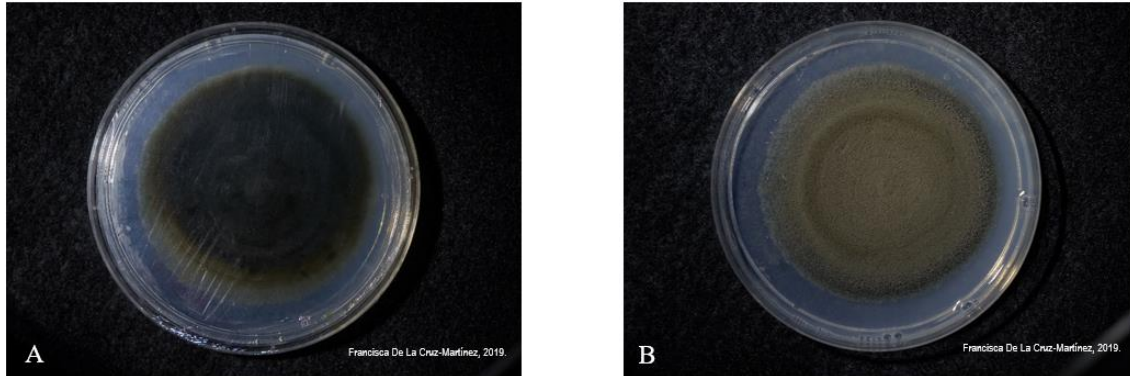


Figura 22. *Cladosporium anthropophilum* (Sandoval-Denis, Gené & Wiederhold): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri

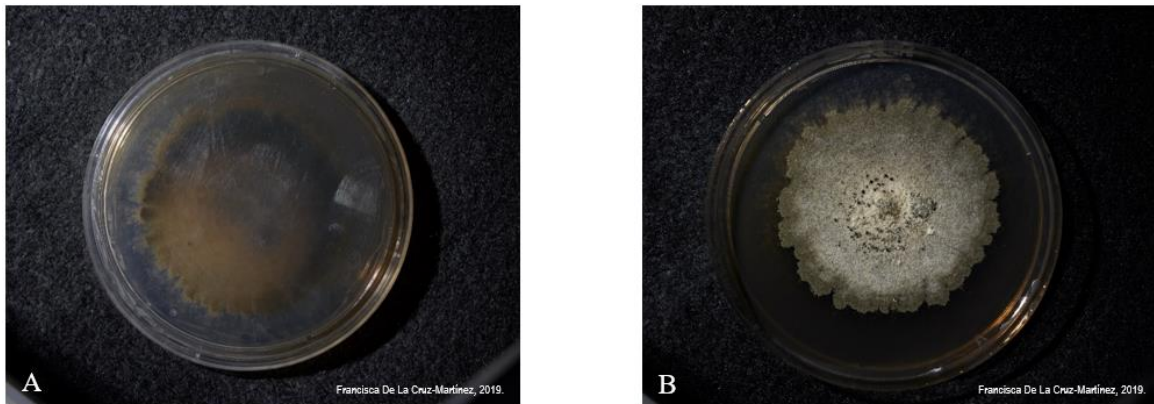


Figura 23. *Stilbocrea gracilipes* (Tul. & C. Tul.; Samuels & Seifert): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.

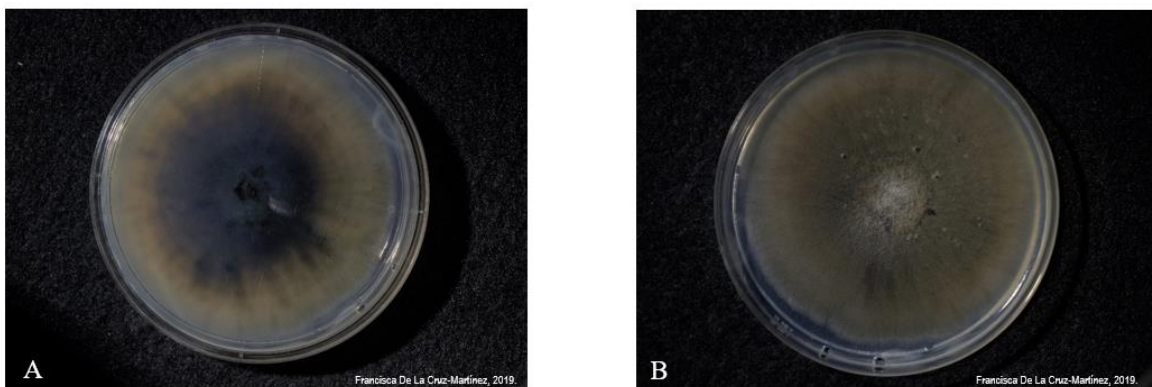


Figura 24. *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (52p= *Curvularia* 2): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.

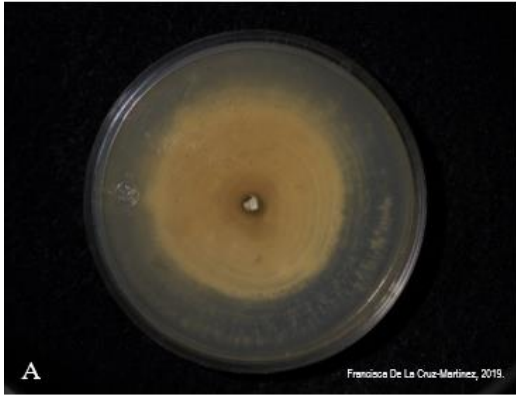


Figura 25. *Geosmithia pallida* (G. Sm.) M. Kolarík, Kubátová & Paoutová: Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.

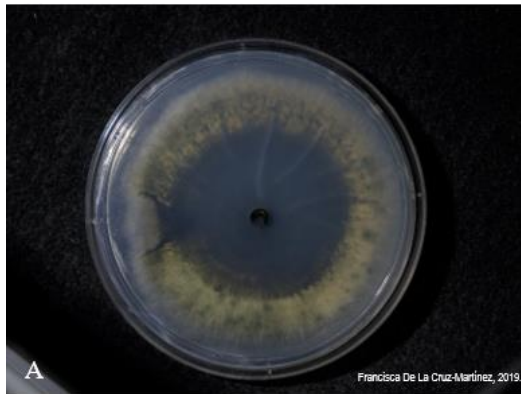


Figura 26. *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (61p = *Curvularia* 1): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.

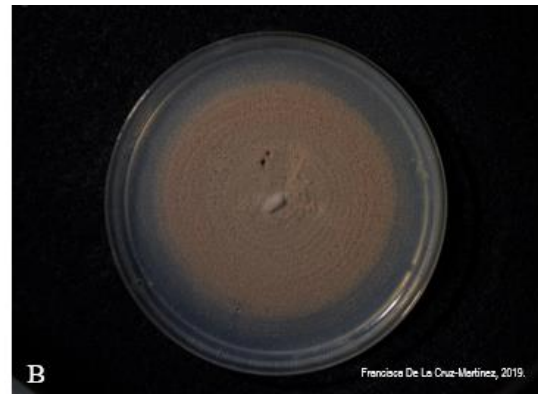
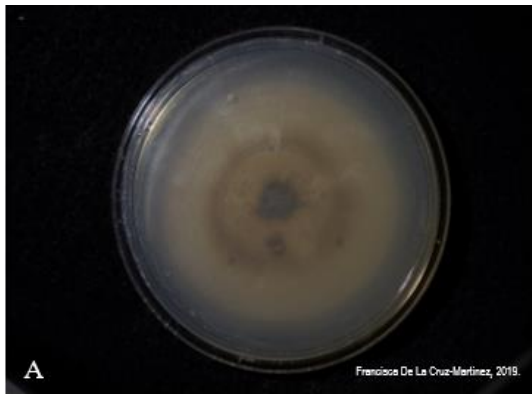


Figura 27. *Purpureocillium lilacium* (Thom.): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.

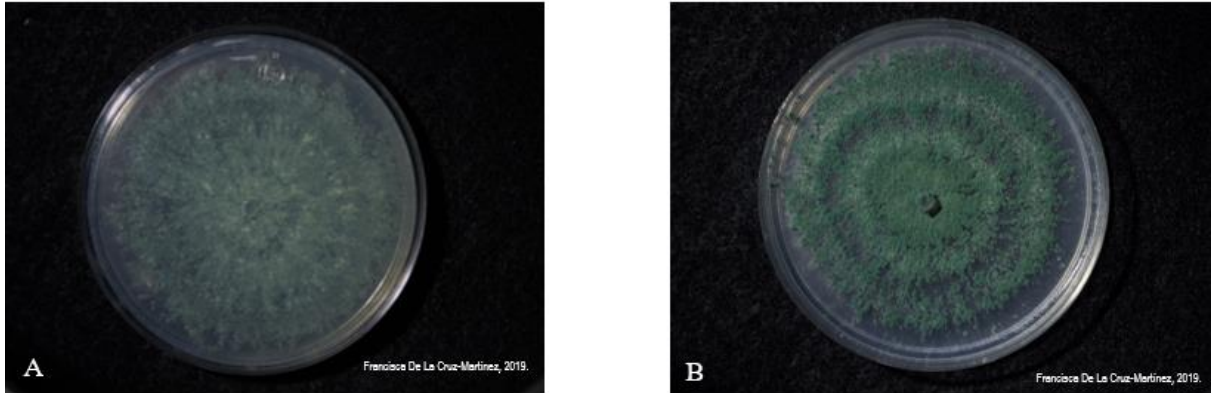


Figura 28. *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg (1999): Reverso (A) y anverso (B) de caja de Petri.



Figura 29. *Citrobacter murlinae* Brenner *et al.* (1999).

Por otra parte, también se entregó respaldo de los aislamientos de los hongos al Laboratorio de Micología del Departamento de Parasitología Agrícola e la Universidad Autónoma Chapingo.

Postulados de Koch.

Se corroboró la misma identidad de las cepas inoculadas en los puntos de inspección. A continuación, se enlistan los puntos de infección por tratamiento y testigo, la evidencia fotográfica es del 12 de noviembre de 2019 y la fecha de inoculación del 11 de julio de 2019, un lapso de cuatro meses, se mantuvieron bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento 1: *Cladosporium anthropophilum* (Figuras 30-34).

Figura 30. Punto de infección 1, tratamiento 1.



Figura 31. Punto de infección 2, tratamiento 1.

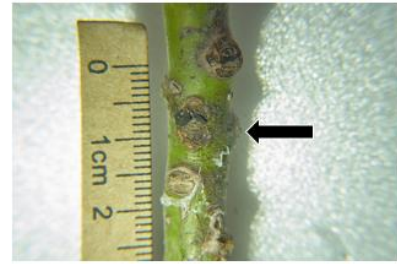


Figura 32. Punto de infección 3, tratamiento 1.



Figura 33. Punto de infección 4, tratamiento 1.



Figura 34. Punto de infección 5, tratamiento 1.



Tratamiento 2: *Stilbocrea gracilipes* (Figuras 35-39).

Figura 35. Punto de infección 1, tratamiento 2.



Figura 36. Punto de infección 2, tratamiento 2.



Figura 37. Punto de infección 3, tratamiento 2.



Figura 38. Punto de infección 4, tratamiento 2.



Figura 39. Punto de infección 5, tratamiento 2.



Tratamiento 3: *Curvularia lunata* 1 (Figuras 40-44).

Figura 40. Punto de infección 1, tratamiento 3.



Figura 41. Punto de infección 2, tratamiento 3.



Figura 42. Punto de infección 3, tratamiento 3.



Figura 43. Punto de infección 4, tratamiento 3.



Figura 44. Punto de infección 5, tratamiento 3.



Tratamiento: 4 *Curvularia lunata* 2 (Figuras 45-49).

Figura 45. Punto de infección 1, tratamiento 4.



Figura 46. Punto de infección 2, tratamiento 4.



Figura 47. Punto de infección 3, tratamiento 4.



Figura 48. Punto de infección 4, tratamiento 4.



Figura 49. Punto de infección 5, tratamiento 4.



Tratamiento 5 *Geosmithia pallida* (Figuras 50-54).

Figura 50. Punto de infección 1, tratamiento 5.



Figura 51. Punto de infección 2, tratamiento 5.



Figura 52. Punto de infección 3, tratamiento 5.



Figura 53. Punto de infección 4, tratamiento 5.



Figura 54. Punto de infección 5, tratamiento 5.



Testigo (Figuras 55-59).

Figura 55. Punto de infección 1, Testigo.



Figura 56. Punto de infección 2, Testigo.



Figura 57. Punto de infección 3, Testigo.



Figura 58. Punto de infección 4, Testigo.



Figura 59. Punto de infección 5, Testigo.



Con las medidas de largo, ancho y áreas obtenidas de los puntos de infección (Anexo 2) se realizaron gráficas para determinar la media y varianza correspondiente, ya que aparte de la incidencia también se determinó la patogenicidad de las cepas (Figura 60).

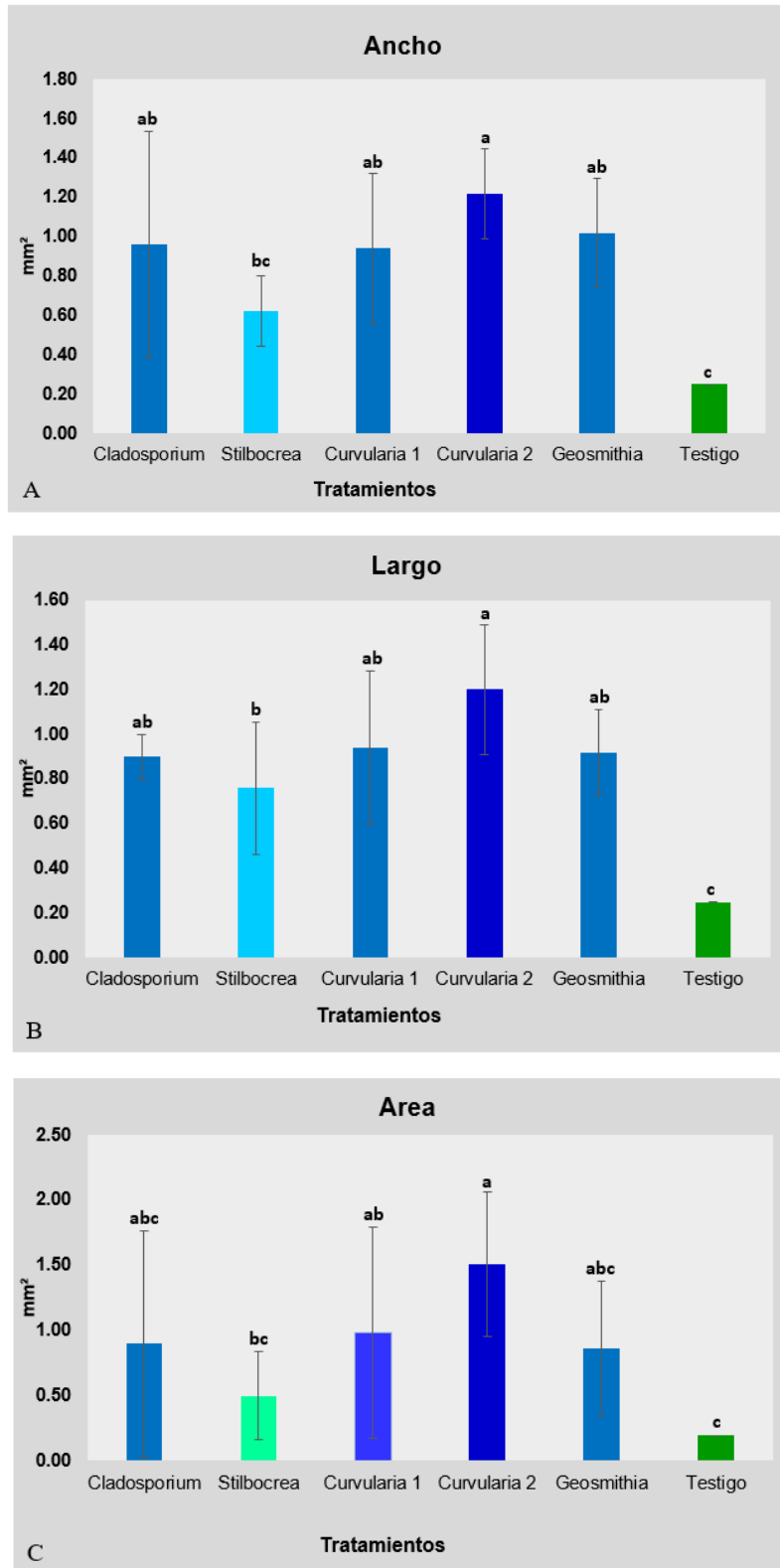


Figura 60. Comparación del ancho (A), largo (B) y área (C) del crecimiento de las cepas inoculadas.

VI. DISCUSIÓN

Referente a la colecta del escolítido mediante trapeo específico, se corroboró la acción del etanol, como atrayente en la captura de *Xylosandrus curtulus*, la cual fue reportada previamente por Lázaro-Dzul (2019). Sólo se colectaron hembras, acorde a Wood (1982), la presencia de machos es extremadamente rara.

El agua destilada utilizada como medio de colecta y de preservación fue de suma importancia para la conservación del micangio, tal como lo señaló Li *et al.* (2018), ya que la disección de insectos muertos, principalmente de especímenes deshidratados por su almacenamiento en alcohol, influye en la observación de micangios en *Xylosandrus*.

De acuerdo a Li *et al.* (2018) que realizó una revisión del micangio en varias especies asiáticas del género *Xylosandrus*, y que algunas de ellas ahora se encuentran en Estados Unidos, el autor encontró una alta similitud de esta estructura en las siguientes especies analizadas: *X. amputatus* (Blandorf, 1894), *X. compactus* (Eichhoff, 1876), *X. crassiusculus* (Motschulsky, 1866), *X. discolor* (Blandford, 1898) y *X. germanus* (Blandorf, 1894); en todas, la ubicación se localizó en el mesotórax, con una alta similitud en su conformación. Es importante indicar que la caracterización del micangio de *X. curtulus* no se había realizado, por lo que existe una alta probabilidad de la generalización de esta estructura en las especies del género *Xylosandrus*.

Por otro lado, Li *et al.* (2018) señalan que el micangio en los Xyleborini es un órgano que está relacionado particularmente con las hembras, que son las colonizadoras y dado que los machos son endogámicos haplo-diploides y no vuelan, probablemente no participan en la transmisión de hongos. Esta estructura abre un abanico de oportunidades, tanto sistemáticamente como biológicamente por los cambios morfológicos considerables y variabilidad intraespecífica, dependiendo de las fases de la simbiosis y de la especie en cuestión.

De la caracterización molecular de este escarabajo ambrosial, Dole *et al.* (2010) estudiaron la monofilía de *Xylosandrus*, considerando 43 especies, de las cuales 15 fueron de *Xylosandrus* y 20 de *Amasa*, *Anisandrus*, *Cnestus*, *Euwallacea* y *Xyleborus*, así como 2 especies de *Coccotrypes*; se utilizaron cinco marcadores moleculares: 28S rDNA; Citocromo C Oxidasa, subunidad I (CO-I); arginina quinasa (ArgK), genes

nucleares “rudimentarios” (CAD) y el Factor de Elongation 1 α (EF-1 α). En sus resultados no obtuvieron clados limpios, a pesar de haber manejado esta diversidad de marcadores. Concluyeron que *Xylosandrus* es un grupo polifilético, por lo que requiere una revisión completa que combine datos moleculares y caracteres morfológicos claros, incluyendo una clave para las especies a nivel mundial.

Cognato *et al.* (2011) estudiaron 155 xyleborinos representando por 23 géneros, usando los mismos marcadores que Dole *et al.* (2010) y 39 caracteres morfológicos; confirmando la polifilía de *Xylosandrus*, que está dividido en cuatro clados distintos morfológicamente. Los caracteres más correlacionados con la filogenia en Xyleborini son el club antenal, la forma del pronoto, los micangios y el escutelo; pero, el carácter más conservado en la tribu es el micangio.

Hu *et al.* (2013) realizaron una investigación de la composición de las poblaciones bacterianas presentes en el intestino del escarabajo chino de pino blanco *Dendroctonus armandi* (Tsai and Li) en diferentes etapas del desarrollo; encontrando que, en hembras adultas, las bacterias predominantes corresponden a *Citrobacter* spp. En ese sentido, en el presente estudio, la cepa bacteriana aislada de hembras colectadas fue *Citrobacter murlinae* Brenner *et al.* (1999).

Respecto a *Purpureocillium lilacinum* (Thom.) Luangsa-ard *et al.* (= *Paecilomyces lilacinus*) es un hongo entomopatógeno de la familia Ophiocordycipitaceae, representa uno de los agentes de biocontrol más prometedores y comercializados para controlar los nematodos parásitos de las plantas, así como otros insectos (*Aphis gossypii*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Tetranychus urticae* y *Acromyrmex lundii*) y patógenos de las plantas (*Phytophthora infestans* y *P. capsici*). Se aísla comúnmente del suelo, raíces de plantas, nematodos e insectos (Wang *et al.* 2016). Por los estilos de vida que muestra este hongo endoparásito, así como los hábitos biológicos y ornamentación del cuerpo de *Xylosandrus curtulus*, es factible realizar su aislamiento.

Cabe mencionar que también obtuvimos la cepa de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg (1999), el cual es enemigo natural de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, entre otros; además puede reducir la incidencia de nematodos y es comúnmente aislado del suelo (EPA, 2011). Algunas especies de *Trichoderma* spp. y *Penicillium* spp. son comunes en las galerías más antiguas de escarabajos

descortezadores, pueden interactuar de manera significativa, pero desconocida, con los escarabajos y los hongos asociados (Six, 2003); entonces, es frecuente el aislamiento de *T. asperellum*, debido a que durante la colonización de nuevos hospedantes, *X. curtulus* podría transportar esporas de esas viejas galerías a nuevos nichos ecológicos.

Acorde a Sandoval-Denis *et al.* (2016), *Cladosporium cladosporioides* es un complejo de especies que integra hongos saprófitos, ubicuos o endófitos vegetales. En el caso de *Cladosporium anthropophilum*, puede tolerar temperaturas hasta de 35°C. El aislamiento de este hongo puede atribuirse a su propia naturaleza, a que el escolítido es muy activo dentro del agroecosistema y en su vestidura (setas) puede transportar esporas, lo que suma las altas probabilidades de su hallazgo. En cuanto a que es endófito vegetal, explica su incidencia como Tratamiento 1 en los puntos de infección establecidos en plantas de aguacate Hass.

Vannini *et al.* (2017 y 2018) realizaron estudios acerca del escarabajo ambrosial asiático *Xylosandrus compactus*, debido a los daños que estaba causando en el maquis mediterráneo, bosques y áreas cultivadas de Italia, Francia y España desde 2014. Para la región de Lazio, se colectaron adultos del cuerpo del insecto y se aisló a *Geosmithia pallida* y de tejidos vegetales asintomáticos y galerías a *Fusarium solani*, *Fusarium proliferatum* y *Nectria haematococca*. Con estos aislamientos inocularon ramitas de *Quercus ilex*, *Laurus nobilis* y *Viburnum tinus*, cuatro meses estuvieron bajo observación debido al lento crecimiento de los hongos en los tejidos vegetales. Las cuatro cepas fúngicas fueron re-aisladas de las lesiones en las ramitas; sin embargo, *Geosmithia pallida* mostró incidencia en *Laurus nobilis* y resultó patogénica en *Quercus ilex* y *Viburnum tinus*, asimismo representó el primer registro de asociación simbiótica con *Xylosandrus compactus*.

Adicionalmente, constituye el primer registro para la región del Lazio, Italia y el primer registro en Europa acerca de un brote y daños graves causados por *X. compactus* y sus hongos ambrosiales asociados en un entorno natural.

Por otro lado, en California, Estados Unidos, *Geosmithia pallida* es un patógeno de robles (encinos) que está causando la enfermedad del chancro espumoso (Lynch *et al.*, 2014), actúa como vector el escarabajo descortezador occidental del roble *Pseudopityophthorus pubipennis* (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). Este hongo

posee afinidad con una gran cantidad de insectos xilófagos y tiene una distribución mundial (Kolařík *et al.*, 2004).

Por su parte, Ángel (2019) de colectas procedentes de Ario de Rosales, Michoacán, aisló hongos simbioses a partir de diluciones de cabeza y protórax de escarabajos ambrosiales, macerados y desinfestados con alcohol al 70%; tomando como referencia la ubicación de los micangios procoxales, en *Monarthrum fimbriaticorne*, *M. exornatum* y *M. conversum*; en *X. affinis* es pre-oral y en *Euplatypus segnis* el micangio pronotal. Los escolítidos se colectaron de la zona aguacatera de Los Reyes, Ziracuaretiro, Tancítaro y Ario de Rosales, Michoacán. De *Monarthrum conversum* se obtuvieron cepas de *Geosmithia* spp., *Raffaelea* spp., *Esteya* spp. y *Ceratocystiopsis* spp.; *Geosmithia* spp. se determina como hongo auxiliar de *M. conversum*.

En el presente estudio se aisló a *Geosmithia pallida* de *Xylosandrus curtulus*, éste último reportado por Lázaro-Dzul (2019) por primera vez para el estado de Michoacán; asimismo, la colecta de escarabajos ambrosiales se realizó en Ziracuaretiro, Mich., mismo sitio de inspección que revisó Lázaro. Esta asociación simbiótica se considera como primer reporte en México, debido a que las investigaciones realizadas por Ángel (2019) mencionan a *Geosmithia* spp., como auxiliar de *Monarthrum conversum*, en Ario de Rosales, Mich. Consecuentemente, hay coincidencia con el aislamiento de *G. pallida* en *Xylosandrus compactus*, considerado primer registro de esta asociación simbiótica en Europa.

Considerando que las investigaciones antes mencionadas se llevaron a cabo en huertos comerciales de aguacate ubicados en Michoacán y que este hongo tiene como hospederos a encinos en Estados Unidos y Europa, así como la diversidad de especies de *Quercus* presentes en México, posicionándolo en segundo lugar a nivel mundial en su diversidad (Silva y Arias, 2016), determinamos la presencia del agente causal de la enfermedad corchosa y el vector en la misma zona aguacatera, por tanto, se considera un riesgo potencial de daño de esta asociación simbiótica, tanto para áreas comerciales de aguacate como áreas naturales.

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn es un hongo con amplio rango de hospederos, desde vegetales, animales e inclusive provocando afectaciones en humanos; actuando como patógeno oportunista, saprófito o endófito (Manamgoda *et al.*, 2015; Crous,

2019). El estado teleomorfo de la especie tipo *Curvularia lunata* es *Cochliobolus lunatus* (Cuervo *et al.*, 2012; Crous, 2019). Su acción fitopatógena se reporta en varios estudios efectuados en pastos y cultivos básicos, como arroz, maíz, trigo y sorgo, así como en especies de las familias Actinidiaceae, Aizoaceae, Anacardiaceae, Caricaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, Iridaceae, Lamiaceae, Lythraceae, Oleaceae, Polygonaceae y Rubiaceae (Manamgoda *et al.*, 2015; Crous, 2019; Rajput & Rao, 2007). Por otro lado, Cuervo *et al.* (2012) reporta a *Cochliobolus lunatus* como patógeno de cacao, cebada, avena, plátano y piña, causando manchas foliares. En tanto que, Ohr *et al.* (2019) enlistan los agentes causales de enfermedades foliares en el aguacatero, incluyendo a *Cochliobolus sativa* (Ito & Kuribayashi) Drechs. ex Dastur.

En ese mismo tenor, del presente estudio se obtuvieron dos cepas de *Curvularia lunata* (*Curvularia* 1 y *Curvularia* 2) de *X. curtulus*; las cuales se establecieron como tratamientos 3 y 4 en las pruebas de patogenicidad en plantas de aguacate, ambas cepas mostraron incidencia en los puntos de infección y de la prueba estadística LSD, *Curvularia* 2 resultó patogénica. Por ello, *Curvularia lunata* se registra por primera vez como patogénica en plantas de aguacate Hass, en Ziracuaretiro, Mich.

Jia-Rong *et al.* (2010) reporta a *Stilbocrea gracilipes* (Tul. & C. Tul.) Samuels & Seifert en conjunto con otros 21 bionectriaceos, en bosques de árboles de hoja ancha en Taiwán, como nuevas especies para ese país. Adicionalmente, este hongo se aisló de la palma reyna *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman, de muestras colectadas en el Parque Nacional Iguazú, Argentina y de la palma Nikau (*Rhopalostylis sapida* y *R. baueri* var. *cheesemani*) en Nueva Zelanda (Capdet, 2012; Mckenzie *et al.*, 2004). Seifert (1985) menciona que *Stilbella clavulata* es la especie tipo y es anamorfo de *Stilbocrea gracilipes* (Mont.) Seifert, comb. nov.

Acorde a la literatura revisada, no hay registros oficiales de que *S. gracilipes* ha sido aislada de escarabajos ambrosiales en México, por lo que este estudio constituye el primer antecedente de este bionectriaceo obtenido de *Xylosandrus curtulus*; además, se estableció como Tratamiento 2 en las pruebas de patogenicidad, mostrando incidencia en plantas de aguacate Hass.

Se observa que cuando se procesan regiones del cuerpo de los escarabajos ambrosiales para determinar microorganismos asociados, aumentan las posibilidades de aislar más de éstos, en comparación a que, si se sembraran solamente los

micangios, las poblaciones obtenidas se limitarían a estas estructuras. En ese sentido, una vez que se aislaron las cepas fúngicas y la bacteriana, los resultados del análisis estadístico indican que no hay diferencia entre lo obtenido de la región de la cabeza o el abdomen. Por lo que en futuros aislamientos debe confinarse al micangio para delimitar la población de microorganismos vectorizados.

En este estudio determinamos que no hay diferencia entre utilizar cámara húmeda o medio de cultivo SNA, pues los análisis estadísticos no presentaron diferencias significativas. El factor que, si es importante, es la colecta realizada en agua destilada ya que permitió la conservación de membranas hidratadas y disponibilidad de microorganismos presentes en los escarabajos ambrosiales, coincidiendo con las revisiones efectuadas por Li *et al.* (2018).

Por otro lado, el método de desinfestación con etanol también influye, pues cuando se realizan tratamientos de limpieza externa (Ángel, 2019; Li *et al.*, 2018), se eliminan patógenos que pueden encontrarse en la vestidura o áreas blandas (membranosas); aunque no se ha comprobado la eliminación total de microorganismos externos con esta limpieza.

Finalmente, es importante indicar que las pruebas de patogenicidad deben realizarse por un periodo mínimo de cuatro meses, tal y como lo realizó Vannini, *et al.* (2017 y 2018) y corroborado en el presente estudio, mismo que incluye los aislamientos correspondientes a Ziracuaretiro, Michoacán, para verificar la manifestación óptima de cada cepa de hongos fitopatógenos; este lapso de tiempo es muy importante, debido a que los hongos que son ambrosiales y de naturaleza fitopatógena son de lento crecimiento.

VII. CONCLUSIONES

- Se registra el primer estudio en México donde se extrae el micangio mesonotal del escarabajo ambrosial *Xylosandrus curtulus*.
- El árbol filogenético de *X. curtulus*, muestra estrecha cercanía entre los escolítidos ambrosiales, por lo que se recomienda que en estudios posteriores además de los marcadores moleculares: 28S rDNA; Citocromo C Oxidasa, subunidad I (CO-I); arginina quinasa (ArgK), genes nucleares “rudimentarios” (CAD) y el Factor de Elongation 1 α (EF-1 α), se complementen con caracteres

taxonómicos para diferenciarlos a nivel de especie. Se aportarán las cuatro secuencias de ADN a la base de datos del NCBI Genbank.

- Como resultado de la diversidad de hospedantes del sitio de inspección y a la función del escarabajo ambrosial, como dispersor de microorganismos, su morfología (micangio, vestidura, áreas de unión, patas, antenas) y polifagia, se obtuvieron aislamientos de *Geosmithia pallida*, *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma asperellum*, *Curvularia lunata*, *Cladosporium anthropophilum* y *Stilbocrea gracilipes*, hongos con acción simbiótica, entomopatógena, antagonista y fitopatógena.
- Primer registro de *Geosmithia pallida* como hongo simbiote de *Xylosandrus curtulus*, colectado en huerto comercial de aguacate en Ziracuaretiro, Michoacán, México.
- La cepa de *Curvularia lunata* se registra por primera vez como patógena en plantas de aguacate Hass, bajo condiciones de invernadero.
- El aislamiento de *Citrobacter murlinae*, bacteria del tracto digestivo, es un antecedente para estudiar asociaciones de microbiota de escarabajos ambrosiales.
- Además de *Xyleborus* spp. y *Euwallacea* spp., hay otros géneros de ambrosiales que pueden ser potenciales dispersores de fitopatógenos en áreas naturales y cultivadas.
- La colecta de *Xylosandrus curtulus* es fundamental realizarla en agua destilada y usar etanol como atrayente. Para aislamientos de patógenos asociados a este escolítido, en la siembra inicial, el método más recomendado por su practicidad y costos mínimos es la cámara húmeda y acotarse al micangio, sin desinfección; así como realizarlo a más tardar a las 72 horas de efectuada la captura y la conservación de la muestra debe ser a -5°C.
- Las pruebas de patogenicidad deben establecerse bajo condiciones de invernadero, con una duración mínima de cuatro meses para el re-aislamiento de las cepas fúngicas ambrosiales en hospederos silvestres y aguacate Hass.

VIII. LITERATURA CITADA

- ÁNGEL, R. M., 2019. Escarabajos ambrosiales y sus hongos simbioses asociados en arboles de aguacate en Michoacán, México. Tesis de Maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- ATKINSON, T. H., 2012. Estado de conocimiento de la taxonomía de los escarabajos descortezadores y ambrosiales de México (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *In: Memoria XVI Simposio Parasitología Forestal. Consejo Nacional Forestal.* 13-27.
- ATKINSON, T. H. & A. EQUIHUA-MARTÍNEZ. 1986. Biology of bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae) of a tropical rain forest in Southeastern Mexico with an annotated checklist of species. *Annals of the Entomological Society of America*, 79: 414-423.
- BATRA, L. R. 1963. Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 66(2): 213-236.
- CAPDET, M. 2012. Biodiversidad de Ascomycetes sexuales y asexuales xilófilos sobre palmeras nativas en la República Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Biblioteca Digital. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5309_Capdet.pdf
- COGNATO, A. I., J. HULCR, S. A. DOLE AND B. H. JORDAL. 2011. Phylogeny of haplo–diploid, fungus-growing ambrosia beetles (Curculionidae: *Scolytinae: Xyleborini*) inferred from molecular and morphological data. *Zoologica Scripta*, 40: 174–186.
- CUERVO-PARRA, J. A., ROMERO-CORTES, T. AND RAMIREZ-LEPE, M. 2012. Isolation and molecular identification of *Curvularia lunata/Cochliobolus lunatus* causal agent of leaf spot disease of cocoa. V International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing countries. Nuevo Vallarta, Nayarit, México. October 24, 25 and 26. ISBN: 978-607-95455-2-9.
- CROUS, P. W. 2019. Genera of Phytopathogenic Fungi (GOPHY). International Subcommission for the Taxonomy of Phytopathogenic Fungi. plantpathogen.org/
- DARRIBA, D., D. POSADA, A. KOZLOV, A. STAMATAKIS, B. MOREL AND T. FLOURI. 2019. Model Test-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Molecular biology and evolution*, msz189, <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>.
- DOLE, S. A., B. H. JORDAL & ANTHONY I. COGNATO. 2010. Polyphyly of *Xylosandrus* Reitter inferred from nuclear and mitochondrial genes (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 773–782.
- DOYLE, J. J. & J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

- DOYLE, J.J. & DOYLE, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1): 13-15.
- ENDO, R., SUZUKI, M. & BENNO, Y. (2008). *Ambrosiozyma kamigamensis* sp. nov. and *A. neoplatypodis* sp. nov., two new ascomycetous yeasts from ambrosia beetle galleries. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94(3), 365-376.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 2011. *Trichoderma asperellum* strain T34 (119209) Fact Sheet. Biopesticides and Pollution Prevention Division-Environmental Protection Agency. Washington, D.C. 20460. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-119209_01-Oct-11.pdf
- HU, X., C. WANG, H. CHEN & J. MA. 2013. Differences in the Structure of the Gut Bacteria Communities in Development Stages of the Chinese White Pine Beetle *Dendroctonus armandi* (Tsai and Li, Scolytidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 21006-21020.
- HUANG, Y-T., SKELTON, J. & JIRI HULCR. 2018. Multiple evolutionary origins lead to diversity in the metabolic profiles of ambrosia fungi. Elsevier Ltd and British Mycological Society. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.03.006>
- HULCR, J. & STELINSKI, L. L. 2017. The ambrosia symbiosis: From evolutionary ecology to practical management. *Annual Review of Entomology*, 62, 285-303. [doi/abs/10.1146/annurev-ento-031616-035105](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035105)
- HULCR, J. & L. QIAO-ZHE. 2013. The redbay ambrosia beetle (Coleoptera: Curculionidae) prefers Lauraceae in its native range: Records from the Chinese National Insect Collection. *Florida Entomologist*, 96 (4): 1595-1596. <https://doi.org/10.1653/024.096.0444>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2009c. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Ziracuaretiro, Michoacán de Ocampo. Clave geoestadística 16111.
- JIA-RONG, G., J. YU-MING & H. HUAN-JU. 2010. Bionectriaceous fungi collected from forests in Taiwan. *Botanical Studies*, 51: 61-74
- KOLAŘÍK, M., A. KUBÁTOVÁ, S. PAŽOUTOVÁ & P. ŠRŮTKA. 2004. Morphological and molecular characterisation of *Geosmithia putterillii*, *G. pallida* comb. nov. and *G. flava* sp. nov., associated with subcorticolous insects. *Mycological Research*, 108(9): 1053-1069. [doi:10.1017/S0953756204000796](https://doi.org/10.1017/S0953756204000796)
- LÁZARO-DZUL, M. O. 2019. Monitoreo de Scolytinae (Coleoptera: Curculionidae) con atrayentes químicos en huertos de aguacate en Michoacán. Tesis Doctoral, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 28-31 p.
- LI, Y., Y. Y. RUAN, E. L. STANLEY, J. SKELTON & J. HULCR. 2018. Plasticity of mycangia in *Xylosandrus* ambrosia beetles. *Insect Science*, 26(4): 732-742.

- LYNCH, C. S., H. D. WANG, S. J. MAYORQUIN, F. P. RUGMAN-JONES, R. STOUTHAMER & A. ESKALEN. 2014. First report of *Geosmithia pallida* causing Foamy Bark Canker, a new disease on coast live oak (*Quercus agrifolia*), in association with *Pseudopityophthorus pubipennis* in California. *Plant Disease*, 98 (9):1276-1276.
- MCKENZIE, E. H. C., P. K. BUCHANAN & P. R. JOHNSTON. 2004. Checklist of fungi on nikau palm (*Rhopalostylis sapida* and *R. baueri* var. *cheesemani*), in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 42 (2): 335-355. DOI: 10.1080/0028825X.2004.9512908
- MANAMGODA, D. S., A.Y. ROSSMAN, L. A. CASTLEBURY, E. CHUKEATIROTE & KEVIN D. HYDE. 2015. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa*, 212(3): 175–198. DOI:10.11646/phytotaxa.212.3.1
- O'DONNELL, K., S. SINK, R. LIBESKIND-HADAS, J. HULCRC, M. T. KASSON, R. C. PLOETZ, J. L. KONKOL, J. N. PLOETZ, D. CARRILLO, A. CAMPBELL, R. E. DUNCAN, P. N. H. LIYANAGE, A. ESKALEN, F. NA, D. M. GEISER, C. BATEMAN, S. FREEMAN, Z. MENDEL, M, SHARON, T. AOKI, A. A. COSSÉ & A. P. ROONEY. 2015. Discordant phylogenies suggest repeated host shifts in the *Fusarium*–*Euwallacea* ambrosia beetle mutualism. *Fungal Genetics and Biology*, 82: 277–290.
- OHR, H. D., M. D. COFFER & R. T. MCMILLAN. 2019. Diseases of Avocado. The American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Avocado.aspx>
- PLOETZ, R.C., J. M. PÉREZ-MARTÍNEZ, J. A. SMITH, M. HUGHES, T. J. DREADEN, S. A. INCH AND Y. FU. 2012. Responses of avocado to laurel wilt, caused by *Raffaelea lauricola*. *Plant Pathology* volumen: 801-808. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02564.x
- RAJPUT, K. S. & K. S. RAO. 2007. Death and decay in the trees of Mango (*Mangifera indica* L.). *Microbiological Research*, 162: 229-237. DOI: 10.1016/j.micres.2004.07.003
- SAMBROOK, J. & D. W. RUSSELL. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Vol. 2, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2100 P.
- SANDOVAL-DENIS, M., J. GENÉ, D. A. SUTTON, N. P. WIEDERHOLD, J. F. CANO-LIRA & J. GUARRO. 2016. New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections. *Persoonia*, 36: 281-298. www.ingentaconnect.com/content/nhn/pimj
- SEIFERT, K.A. 1985. A monograph of *Stilbella* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology* (CBS), 27: 1-235. <http://www.wi.knaw.nl/publications/1027/fulltext/index.html?i=17>

- SENASICA. 2017. Protocolo de diagnóstico fitosanitario “Amplificación de la región mtDNA CO-I, para la identificación de insectos por PCR punto final LC01490/HC02198-SENASICA”. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/327462/AMPLIFICACION_DE_LA_REGION_mtDNA_COI.PDF
- SIEVERS, F. & D. G. HIGGINS. 2014. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods in Molecular Biology*, 1079: 105-116.
- SILVA, C. A. & X. ARIAS V. 2016. Encinos de México: Visión Actual. Congreso Nacional de estudiantes de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Chapingo, México. DOI: 10.13140/RG.2.1.4965.2722.
- SIX, D. L. 2003. Bark beetle-fungus symbiosis. In *Insect symbiosis*, ed. K. Bourtzis and T. A. Miller, pp. 97–114. Boca Raton, FL: CRC Press.
- SUCHARD, M., P. LEMEY, G. BAELE, D. AYRES, A. DRUMMOND AND A. RAMBAUT. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1): 1-5.
- VANNINI, A., M. CONTARINI, M. FACCOLI, C. DELLA VALLE, R. C. MORALES, T. MAZZETTO, D. GUARNERI, M. A. VETTRAINO & S. SPERANZA. 2017. First report of the ambrosia beetle *Xylosandrus compactus* and associated fungi in the Mediterranean maquis in Italy, and new host–pest associations. *EPPO Bulletin* 0, 1–4. DOI: 10.1111/epp.12358
- VANNINI, A., S. SPERANZA, M. CONTARINI, I. SFERRAZZA, F. MICHELANGELI AND CARMEN MORALES RODRIGUEZ. 2018. State of the Art: The Ambrosia beetle *Xylosandrus compactus* and the symbiotic fungi: a new risk for European native flora associated to nurseries and trading of living plants. Diseases and insect forest nurseries working party meeting. International Union of Forest Research Organizations (IUFRO). Kuşadası, Turquía.
- WANG, G., Z. LIU, R. LIN, E. LI, Z. MAO, J. LING, Y. YANG, Y. WEN-BING & X. BINGYAN. 2016. Biosynthesis of antibiotic leucinostatins in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition on *Phytophthora* revealed by genome mining. *PLOS Pathogens*, 12(7): 1-30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005685>
- WARHAM, E. J. L., D. BUTLER & B. C. SULTON. 1998. Ensayos para la Semilla de Maíz y Trigo: manual de laboratorio. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT. México. D. F. 84p.
- WHITE, T. J., T. D. BRUNS, S. B. LEE & J. W. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*, Academic Press, pp.315-322.

WOOD, S. L. 1982. The Bark and Ambrosia Beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. Brigham Young University. Provo, Utah. Great Basin Nat. Mem. No. 6: 24-26, 765.

ANEXOS

ANEXO 1. Medidas de Puntos de infección en prueba de patogenicidad.

Tratamiento	Punto de infección	Ancho	Largo	Área (mm ²)
Cladosporium	1	0.90	0.90	0.81
Cladosporium	2	0.50	0.80	0.40
Cladosporium	3	1.00	1.00	1.00
Cladosporium	4	0.50	0.80	0.40
Cladosporium	5	1.90	1.00	1.90
Stilbocrea	6	0.50	0.50	0.25
Stilbocrea	7	0.90	1.20	1.08
Stilbocrea	8	0.70	0.70	0.49
Stilbocrea	9	0.50	0.50	0.25
Stilbocrea	10	0.50	0.90	0.45
Curvularia 1	11	0.80	0.80	0.64
Curvularia 1	12	0.60	0.60	0.36
Curvularia 1	13	1.60	1.50	2.40
Curvularia 1	14	0.80	1.00	0.80
Curvularia 1	15	0.90	0.80	0.72
Curvularia 2	16	1.30	1.20	1.56
Curvularia 2	17	1.10	1.30	1.43
Curvularia 2	18	1.50	1.40	2.10
Curvularia 2	19	1.30	1.40	1.82
Curvularia 2	20	0.90	0.70	0.63
Geosmithia	21	0.90	0.90	0.64
Geosmithia	22	0.80	0.80	0.50
Geosmithia	23	0.90	1.00	0.64
Geosmithia	24	1.00	0.70	0.79
Geosmithia	25	1.50	1.20	1.77
Testigo	26	0.25	0.25	0.20
Testigo	27	0.25	0.25	0.20
Testigo	28	0.25	0.25	0.20
Testigo	29	0.25	0.25	0.20
Testigo	30	0.25	0.25	0.20

ANEXO 2 Secuencias genómicas de aislamientos de hongos y bacteria.

19-1228-BM *Citrobacter murlinae*

AGCGGCAGCTACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCG
GCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
AGCTAATACCGCATAAYGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGAT
GTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGG
CCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTACAGCGAGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTG
ACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT
GCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG
AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGG
GGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGG
CGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTC
CGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAA
TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
ACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACA
GGTGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAATGTGGGTAGTCCCGCACGAGCGCACCTTA
TCTTGGTGCAGCGTCGCGCACTCAAGAACTGCAGTGATAACTGCAGAGGTGGGGATGACGTTCA

19-1829-BM *Geosmithia pallida*

GGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAGAGTTA
CAAACCTCAAACCATTGTGAACATACCTACGTTGCTTCGGCGGCCCTCGCCCCGGGCGTCGCGG
TGCCCTCACGGGAGCCGCGGCGGCCGACCCAGGCGACCGCCGGGGGACCCAAACTCTTGT
TTTTAGTGTCTTCTGAGTGGCATAAGCAAATAATCAAACCTTTACGCAACGGATCTCTTGTT
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTACTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC
ATTTCAACCCTCAGCACCCGCTTCGCGGTGGGAGCTGGCGTTGGGGATCGGCCGCCCTCAG
CGGCGGCCGGCCCCGAAACGAAGTGGCGGCCGCGTCCGACCTCCTCTGCGCAGTAGCGAT
ACCTCGCAGCCTGGATAGCGGTGCGGCCACGCCGTAAACCCCAACTTTTACAAGGTTGACCT
CGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

19-1830-BM *Cladosporium anthropophilum*

CCTCCCGAACACCCTTTAGCGAATAGTTTTCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGT
CGATTTGAGGCACGCGGCGGACCGCGATGCCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTGAAATG
ACGCTCGAACAGGCATGCCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATG
ATCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAA
CCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTAATTTATTAATTAAGTTTACTCAGACTGCAAAGTTACGCA
AGAGTTTGAAGTGTCCACCCGGAGCCCCCGCCGAAAGGCAGGGTTCGCCCCGGAGGCAACAGA
GTCGGACAACAAAGGTTATGAACATCCCGGTGGTTAGACCGGGGTCACTTGTAATGATCCCT
CCGAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTTACTTCC

19-1832-BM *Purpureocillium lilacinum*

CCGCTCCGCGCTCCGGTGCAGGTGTGTGCTACTACGCAGGGGAGGCTGCGGCGGGGTCCG
CCTACTGATTTCCGGG

19-1831-BM *Stilbocrea gracilipes*

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTATT
CAACTCCCAAACCCTGTGAACTTTACCAATGTTGCTTCGGCGGAGTCGTCCCGGGTGCGCTC
GAAAGGGCGTGTCCCGGATCCATGGCGCCCGCGGGGGATCTATACTCTTGTTTTTATAGTGG
TATCTTCTGAGTGGCATAAGCAAAATAATCAAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
TCTTTGAACGCATATTGCGCCCGGTAGTACTCTACCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCGGGACCCGTTTCGGCGGGACCCGGCGTTGGGGATCGGCCGTCTCTGCGGCGCGCC
GGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGTTGTGACTCCCTGCGTAGTAGTAACATCTCGCATGC
GGATAGCGACGGGGCCACGCCGTA AACCCCAACTTTATCAAGGTGGACCTCGGATCAGGAA
GGAATACCCGTTGNCTTAAAAAATATCATTAACGCAG

19-1833-BM *Trichoderma asperellum*

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTA
CAACTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAATGTTAAGGCCCTACGAGCAGAGGAGTTCACG
CCCTCGGGTGGCGTACGCAGCCTCCGAAACCAGGGCGCCTCGCCAGAGACGAGAAACCCAAA
CTCAAGACTACTTATCTCCGTAAGTACCTCTACGCAGGAACGTAGCATCTTAACAGCTATCGAG
CAAAAGATACAAAGACGAATACAATAACTTTTTCAATCAACGGAATCTACTTCGGTTATCGGCATA
CGATCGAGAGAAACGCAAGCGAAAATCGCGATAAAGTAATCGTGAATTCGCAGAATTTAGTGG
AATTCATTGCAATCTTTGCAACGCACATTGCGGCTCCGCCAGTATTTCTGGGCGGGCATGCCT
GTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCC
CTCACACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTGCGCAGTA
GTTTGCAAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAAACCCCAACTTTCTGAA
ATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAAAGCCGGAGGAAA

19-1834-BM *Curvularia lunata* 61p

GCTGAiTGCAAGCGCAAAAAAtGtGCTGCGCTGCGAAACCAGTAGGCCGGGctGCCAATCGTTTTAA
GGCGAGTCTTcGGGCGAGGCCAAAGACAAAAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTtGAAGGTA
CAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTtGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATT
CGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGC
CAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATGATTTACATTTGTTATACTGACGCTGATTG
CAACTGCATAAAAAAGGTTTATGGTGTGGTCTGGTGGCGGGCGAAACCCGCCAGGAAACAAC
AAGTGCGCAAAAAGACAAGGGTGATAAAAATAATCCAGCCGAAGCCTTCATATTTTAATTTGTGTA
ATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGATTTTTTACTTCCA

19-1835-BM *Curvularia lunata* 52p

CGTCCTTTTTGCTGATTGCAAGCGCAAAAAAtGtGCTGCGCTGCGAAACCAGTAGGCCGGCTCGC
CAATCGTTTTAAGGCGAGTCTTTGGGCGAGGCCAAAGACAAAAAGACGCCCAACACCAAGCAA
AGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGT
GCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTCGCTGCGT
TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATGATTTACATTTGTTATA
CTGACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAGGTTTATGGTGTGGTCTGGTGGCGGGCGAAACCCG
CCCAGGAAACAACAAGTGCGCAAAAAGACAAGGGTGATAAAAATAATCCAGCCGAAGCCTTCATA
TTTTAATTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTTTACTT
CCACAA