SCIENTIA FUNGORUM

DOI: 10.33885/sf.2026.57.1506
(2026) Vol. 57: e1506

Diversidad genética de *Neopestalotiopsis* sp. en fresa, evaluada mediante RAPD y grupos de compatibilidad micelial

Genetic diversity of *Neopestalotiopsis* sp. in strawberry, evaluated using RAPD and mycelial compatibility groups

Lizeth Alejandra Velasco-Lopez[1], Isidro Humberto Almeyda-León[2], Raúl Rodríguez Guerra[2], Ma. Elizabeth Galindo Cepeda[1], Abiel Sánchez Arizpe[1], Juan Carlos Delgado Ortiz[1], Epifanio Castro-del Ángel[1]

[1] Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.
[2] Campo Experimental General Terán. INIFAP. Carretera Montemorelos-China, km 31. Colonia Ex-Hacienda Las Anacuas, C.P. 67413. General Terán, Nuevo León, México.

RESUMEN

Antecedentes: En México, el cultivo de fresa es afectado por *Neopestalotiopsis*, que daña diversos órganos de la planta y reduce el rendimiento. La variación en los síntomas sugiere una alta diversidad genética del patógeno, lo que hace necesario estudiar su estructura poblacional para mejorar su manejo.

Objetivo: Analizar la variabilidad genética de cepas de *Neopestalotiopsis* aisladas de plantas de fresa en el estado de Michoacán, con el fin de aportar información que contribuya al conocimiento de la diversidad del patógeno y su posible relación con la sintomatología observada.

Metodología: Se caracterizaron morfológica y molecularmente 17 cepas de *Neopestalotiopsis* aisladas de fresa de tres municipios (Maravatío, Irimbo y Epitacio Huerta) de Michoacán, se describió el color de la colonia, presencia de acérvulos y dimensiones de los conidios. Se evaluó la variabilidad genética mediante RAPD e ITS, se construyó un árbol filogenético y se utilizaron pruebas de compatibilidad micelial para complementar el análisis.

Resultados y conclusiones: Las observaciones morfológicas y análisis RAPD revelaron una variabilidad genética considerable, agrupando las cepas en cinco conjuntos principales. Esta diversidad refleja la presencia de linajes cercanos y diferenciados, lo que sugiere una estructura poblacional compleja y posiblemente asociada a la variedad de síntomas observados en campo.

Palabras clave: grupos vegetativos, marcadores moleculares, polimorfismo

ABSTRACT

Background: In Mexico, strawberry cultivation is affected by *Neopestalotiopsis*, which damages several plant organs and reduces yield. The variation in symptoms suggests a high genetic diversity of the pathogen, which makes studying its population structure necessary to improve its management.

Objective: To analyze the genetic variability of *Neopestalotiopsis* strains isolated from strawberry plants on three municipalities in the state of Michoacan, in order to provide information that contributes to the understanding of the pathogen's diversity and its possible relationship with the observed symptomatology.

Methodology: Seventeen *Neopestalotiopsis* strains isolated from strawberry in Michoacan were characterized morphologically and molecularly, describing their colony color, presence of acervuli, and conidial dimensions. Genetic variability was assessed using RAPD and ITS, a phylogenetic tree was constructed, and mycelial compatibility tests were used to complement the analysis.

Results and conclusions: Morphological observations and RAPD analyses revealed considerable genetic variability, clustering the strains into five main groups. This diversity reflects the presence of close and differentiated lineages, suggesting a complex population structure and a possible association with the variety of symptoms observed in the field.

Keywords: Vegetative compatibility groups, molecular markers, polymorphism

ARTICLE HISTORY

Received: 11/11/2025
Accepted: 01/03/2026
On line: 29/05/2026

CORRESPONDING AUTHOR

Epifanio Castro-del Ángel, e-mail: epifanio.castro@uaaan.edu.mx
Orcid: 0000-0002-5534-1262

INTRODUCCIÓN

En México, la fresa se cultiva en 16 entidades federativas, alcanzando un valor de producción $17,198 miles de millones de pesos. Los principales estados productores son Michoacán, Baja California y Guanajuato, los cuales concentran la mayor parte de la producción nacional (SIAP, 2024). Sin embargo, las enfermedades emergentes causadas por el hongo *Neopestalotiopsis*, particularmente *Neopestalotiopsis rosae*, han representado un desafío en el cultivo de fresa en nuestro país (Rebollar-Alviter *et al.* 2020).

Si bien pueden existir variaciones leves en la expresión de los síntomas según el órgano afectado o las condiciones ambientales, el cuadro general de la enfermedad tiende a ser consistente entre especies. En Norteamérica (EE. UU. y Canadá), por ejemplo, *N. rosae* y otras especies del género han sido vinculadas principalmente con manchas foliares y pudrición del fruto, que afecta la calidad comercial de la cosecha. Estudios en Florida y California también describen manifestaciones severas, con marchitez y muerte de plantas sometidas a una alta severidad de la enfermedad (Baggio *et al.* 2021; Lawrence *et al.* 2023). Para el caso de México este patógeno ha sido identificado como el agente causal de manchas foliares en hojas, pudrición de la raíz y corona, provocando una reducción en el rendimiento (Ayoubi y Soleimani 2016, Rebollar-Alviter *et al.* 2020; Olivares-Rodríguez *et al.* 2024, Cervantes-Zúñiga *et al.* 2025).

La distribución global de *Neopestalotiopsis* se caracteriza por una marcada variabilidad en la expresión sintomatológica, lo cual plantea desafíos significativos para el manejo fitosanitario según la región geográfica. Mientras que en Sudamérica la patogénesis se manifiesta predominantemente como podredumbre de corona y raíz asociada a especies como *N. clavispora* y *N. mesopotamica* (Hidrobo-Chavez *et al.* 2022, Obregón *et al.* 2018; Machín *et al.* 2019), en el contexto europeo se reporta una transición entre afecciones radiculares y daños aéreos que incluyen tizones foliares y del fruto (Chamorro *et al.* 2016, Gilardi *et al.* 2019, Schierling *et al.* 2024). Esta plasticidad patogénica alcanza su máxima complejidad en Asia, donde se han documentado cuadros severos que integran simultáneamente el marchitamiento radicular y la afectación de estructuras reproductivas y foliares (Shi *et al.* 2022, Wu *et al.* 2021, Rakhonde *et al.* 2025). En el año 2018, en el municipio de Jacona, Michoacán, se reportó la incidencia de una etiología desconocida en cultivos de fresa. El cuadro sintomatológico se caracterizó por la presencia de lesiones foliares y pudrición radicular, evolucionando hacia la muerte sistémica de la planta y demostrando un elevado potencial de daño económico (SENASICA 2022).

Estudios previos realizados desde 2017 en la región de Zamora, Michoacán, indican que el patógeno fúngico responsable se dispersa a largas distancias mediante la movilización de material vegetativo infectado proveniente de viveros. Una vez establecido en campos comerciales, la progresión epidemiológica del tizón y las manchas foliares ocurre principalmente por la dispersión mecánica mediada por el salpique de lluvia, el cual moviliza los propágulos desde los tejidos infectados hacia órganos sanos (Rebollar-Alviter *et al.* 2020). Plantas de fresa de viveros de Jalisco con síntomas de pudrición de raíz y corona fueron sometidas a análisis, confirmándose que la infección fue causada por el hongo *N. rosae* (Acosta-González *et al.* 2024). Comprender estos patrones de daño sistémico y localizado es fundamental para mitigar las pérdidas de vigor y rendimiento en los sistemas de producción intensiva actuales.

Debido a lo anterior, estudiar la variabilidad genética en hongos fitopatógenos es esencial para anticipar y controlar brotes de enfermedades, ya que poblaciones con gran diversidad tienen mayor probabilidad de generar variantes resistentes a fungicidas o capaces de evadir cultivares con resistencia genética (Zhang *et al.* 2023).

La identificación mediante la secuenciación completa del genoma es un método preciso, aunque suele ser tardado y costoso. Por ello, se han desarrollado alternativas basadas en marcadores moleculares de ADN que utilizan la técnica de PCR. Entre ellos, los RAPD continúan siendo una herramienta útil para detectar diversidad genética (Oliveira y Azevedo, 2022). Kermani *et al.* (2016) también reportaron variaciones genéticas tanto intra como interespecíficas en *Aspergillus*, utilizando RAPD-PCR como un método rápido y sensible a partir de muestras atmosféricas. De acuerdo con Valencia-Ledezma *et al.* (2022), esta técnica permite explorar la variabilidad genética al generar patrones de amplificación específicos que reflejan diferencias entre organismos. Su eficacia ha

sido comprobada para distinguir especies con alta similitud morfológica, como en el caso de *Aspergillus*, donde los perfiles obtenidos con distintos cebadores lograron diferenciarlas con gran precisión.

De manera adicional la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal se considera el marcador universal para hongos por su variabilidad y facilidad de amplificación, siendo clave en la identificación y análisis filogenético. Su uso como "DNA barcode" ha sido ampliamente validado, aunque puede presentar limitaciones de resolución en linajes crípticos (Schoch *et al*. 2012, Bellemain *et al*. 2010). Finalmente, los grupos de compatibilidad micelial (VCGs) constituyen una herramienta biológica que agrupa cepas capaces de formar heterocariones viables. En *Verticillium dahliae*, los VCGs han mostrado correlación con diversidad genética y distribución poblacional, aportando información valiosa sobre la epidemiología de los patógenos (Collado-Romero *et al*. 2006).

En este contexto, el objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética de cepas de *Neopestalotiopsis* spp. obtenidos de cultivos de fresa en Michoacán, mediante el uso de marcadores RAPD, la evaluación de grupos de compatibilidad micelial y a sus relaciones filogeneticas basados en secuencias a partir de la región ITS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras

Se colectaron muestras de tejido en plantas adultas de fresa en viveros y parcelas comerciales en tres municipios del estado de Michoacán: Irimbo (IRI), Maravatío (Mar) y Epitacio Huerta (E.H), principalmente hojas, coronas y pecíolos con lesiones necróticas. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Fitopatología de Postgrado del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. El aislamiento del patógeno se llevó a cabo siguiendo la metodología de Torres-Calzada *et al*. (2013) y la purificación de este se hizo a través de cultivos monoconidiales.

De un total de 702 aislamientos, considerando la tasa de crecimiento, el color de la colonia y la abundancia de acérvulos se seleccionaron 17 para su caracterización mediante las claves de Maharachchikumbura *et al*. (2014). Entre las características morfológicas utilizadas para la identificación del género *Neopestalotiopsis* se examinó el color de la colonia, la presencia o ausencia de acérvulos, las dimensiones del cuerpo: largo total, ancho máximo y longitud de las tres células medias pigmentadas (célula 1, 2 y 3), así como la longitud de los apéndices apicales (1, 2 y 3), longitud del apéndice basal y posición de los septos (1 al 4) (Keith *et al*. 2006, Maharachchikumbura *et al*. 2011). Con el objetivo de determinar la longitud, el ancho y el número promedio de apéndices presentes en las conidias, se seleccionaron 150 conidias maduras por cada aislado, obtenidos de cultivos de 15 días de antigüedad. Las conidias fueron montadas en portaobjetos y teñidas con azul de algodón para mejorar el contraste. Posteriormente, se capturaron fotografías utilizando un microscopio compuesto (Olympus CX31) con un aumento de ×400 y una cámara Dino-Lite. Las mediciones se realizaron en el software DinoXcope V2.6. Para el análisis morfométrico se realizaron 150 mediciones por cada una de las 18 variables morfológicas en cada cepa (n=150), sumando un total de 2 550 registros de datos primarios. Cada conidia fue dividida en cinco secciones con el fin de describir detalladamente su estructura (Figura 1): la sección 1 correspondió a los apéndices apicales, la sección 2 a la célula apical, la sección 3 a las tres células medias, la sección 4 a la célula basal y la sección 5 al apéndice basal.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante las siguientes etapas:

Se calculó la media y la desviación estándar para cada variable por cepa. Fueron determinados índices: se calculó el índice de forma también denominado valor Q (Q = L / W) para evaluar la elongación conoidal, donde: L es la longitud del eje mayor sin incluir el pedícelo y W es la anchura del eje menor en su punto más ancho), con la finalidad de tener un soporte estadístico (Fiorenza *et al*. 2022), asimismo, se determinó el coeficiente de variación para cuantificar la dispersión fenotípica entre las cepas. Seguido de una matriz de correlación de Pearson para identificar relaciones alométricas entre el crecimiento del cuerpo y sus apéndices. Finalmente, se realizó un análisis de

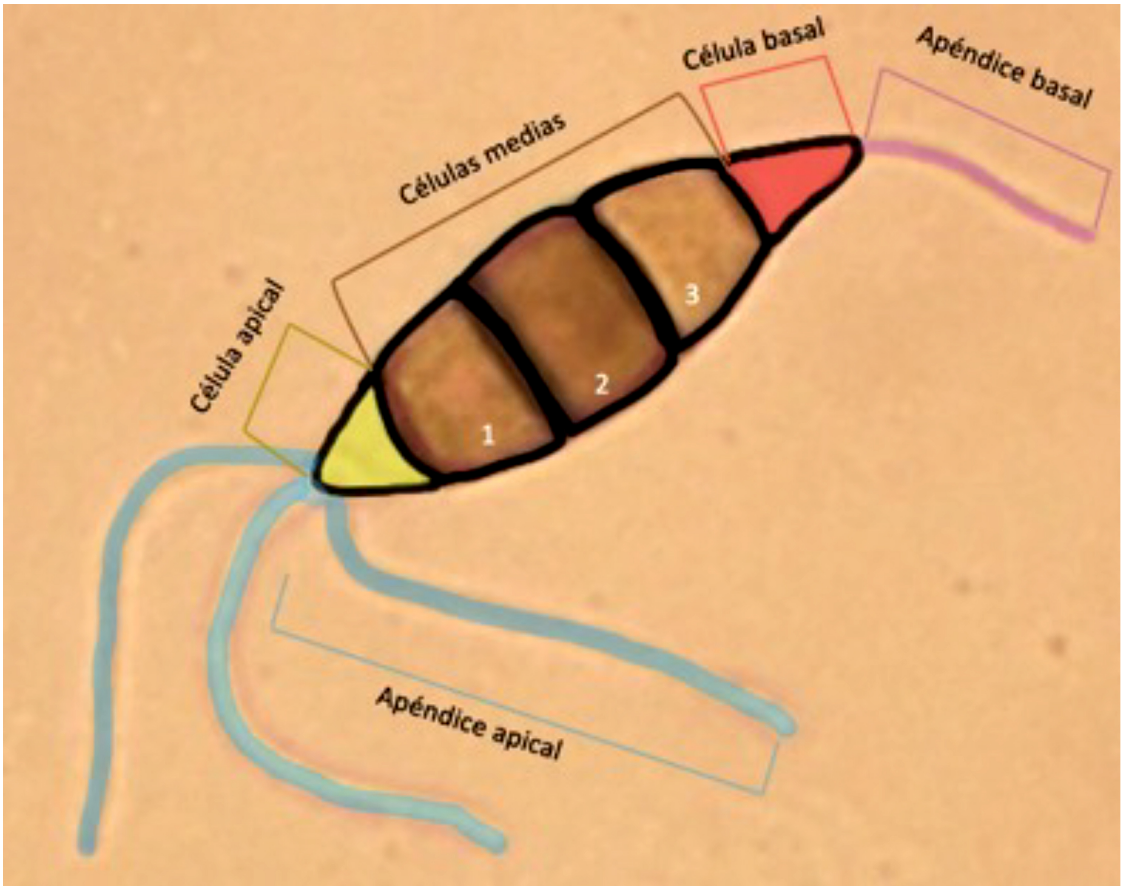


Figura 1. Esquema de las secciones medidas en las conidias de *Neopestalotiopsis* sp.

agrupación para categorizar las cepas en morfotipos (macromorfo, mesomorfo y braquiomorfo) basándose en sus perfiles dimensionales.

Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Raeder y Broda (1985), con modificaciones menores. El micelio se obtuvo a partir de fragmentos de colonias cultivadas en caldo de dextrosa y papa (PDB) bajo agitación a 150 rpm y 25 °C. Posteriormente, el material se lavó con buffer TE 1X y se procedió a ruptura celular mediante un disruptor mecánico para facilitar la liberación del ADN. La extracción se realizó con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), y el ADN se precipitó con isopropanol y acetato de sodio. El pellet resultante se lavó con etanol al 70 %, se secó y se resuspendió en buffer TE 1X. Finalmente, el ADN se trató con RNasa para eliminar residuos de ARN. La integridad y pureza del ADN se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría (NanoDrop).

Amplificación de los genes ITS

La amplificación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) se realizó en un volumen final de 25 µL. La mezcla de reacción incluyó: 2.5 µL de buffer, 1.75 µL de $MgCl_2$, 0.5 µL de dNTPs, 1 µL de cada cebador (ITS1 e ITS4), 17.05 µL de agua ultrapura, 0.2 µL de Taq ADN polimerasa y 1 µL de ADN molde. Se utilizaron los cebadores ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3') descritos para la amplificación de esta región) (White *et al*. 1990). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 56 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 90 segundos. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C por 8 minutos. Los productos de la PCR obtenidos fueron purificados enviados para su secuenciación al laboratorio IPICYT (San Luis Potosí, México).

Construcción del árbol filogenético de ITS

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa MEGA 12 (Tamura *et al*. 2021) y se alinearon utilizando el software MAFFT v7 (Katoh y Standley 2013). El archivo de alineamiento resultante en formato FASTA se empleó posteriormente para inferir el árbol filogenético mediante el servidor en línea IQ-TREE (Nguyen *et al*. 2015). Para la construcción del árbol, se seleccionó el modelo evolutivo K2P+G4, determinado a través de ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al*. 2017). La robustez de la topología se evaluó con el método de bootstrap ultrarrápido utilizando 10,000 réplicas (Hoang *et al*. 2018). Finalmente, el árbol filogenético se visualizó en el programa FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2016) y se editó en Inkscape para su presentación.

Amplificación RAPD

El ADN genómico de las cepas se cuantificó con un NanoDrop y se ajustó a 25 ng en 2 µL para cada reacción. Las amplificaciones RAPD se realizaron en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico de Enfermedades Cuarentenarias del Campo Experimental General Terán perteneciente al INIFAP. Se utilizaron los iniciadores: P23 (5'-GGCGATCACG-3'), P30 (5'-CTCCTGCGAC-3'), mezcla de primer 23 y 30, P2 (5'-CGAACATGAG-3'), P31 (5'-CGACCCCCGT-3'), mezcla de los iniciadores P31 y P35 (5'-GCTGGGGACC-3') (Orona *et al*. 2004). La amplificación de ADN se realizó en un volumen final de 25 µL por reacción, que incluyó: 5 µL de buffer (1X), 2 µL del iniciador respectivo, (0.05 µL), 0.3 µL de enzima ADN polimerasa (1.5U), 13.5 µL de agua bidestilada ultrapura y 4 µL (100 ng) de ADN genómico previamente estandarizado. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 36 °C por 2 minutos y extensión a 72 °C por 1 minuto. Finalmente, se realizó una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos de PCR se visualizaron inicialmente en geles de agarosa al 3 % corriendo a 100 V durante 40 minutos. La presencia y el tamaño de las bandas se confirmaron en un transiluminador. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 6 % (preparados con 22.7 mL de agua bidestilada, 8 mL de buffer BS 5X, 5.6 mL de acrilamida al 30 %, 60 µL de TEMED y 300 µL de APS al 15 %) corriendo a 90 V durante 3 horas. Esta actividad se realizó en el Laboratorio No. 4 en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Análisis de datos

A partir del perfil electroforético se obtuvieron matrices binarias de presencia/ausencia de fragmentos, a esta matriz se le calculó el índice de similitud de Nei y Li (1979) y con este se construyó un dendrograma utilizando el método de aglomeración UPGMA y el método Bootstrap con 1000 remuestreos de acuerdo con recomendaciones de Núñez-Colín y Escobedo-López (2014), utilizando FreeTree (Hampl *et al.*, 2001). Además, la matriz del índice de similitud fue centralizada y se obtuvo un Análisis de Coordenadas Principales (Gower, 2005; Peña-Caballero *et al.*, 2020) y se generó una proyección de las accesiones en un plano tridimensional utilizando NTSYS versión 2.2 (Rolfh, 2005). Adicionalmente, para los marcadores se les calcularon los parámetros número de fragmentos, fragmentos polimórficos, % de polimorfismo, así como los índices del Contenido de Información Polimórfica (PIC).

El valor de PIC para cada marcador se calculó con la formula PIC= 2fi (1-fi), propuesta por Roldán-Ruiz *et al*. (2000). Dónde: PIC es el contenido de información polimórfica del marcador i, fi la frecuencia de los fragmentos del marcador que estaban presentes y 1-fi la frecuencia de los fragmentos del marcador que estaban ausentes. El PIC fue un promedio de los fragmentos para cada marcador.

Para cada fragmento se calculó el índice de Shannon (Shannon, 1948) y se promediaron los valores de cada fragmento para cada iniciador para calcular el valor promedio por iniciador.

El índice de Shannon se calculó mediante la fórmula:

$$SI = -1 * [p * log_2 (p) + (1-p) * log_2 (1-p)]$$

Donde p es la proporción de presencia del fragmento en las cepas.

Grupos de compatibilidad micelial

Earnshaw y Boland (1997) describieron los grupos de compatibilidad micelial como una herramienta indirecta para detectar variabilidad genética en hongos. Con base en esta metodología, se llevaron a cabo pruebas de compatibilidad micelial en 45 cajas Petri, colocando cuatro discos de PDA con crecimiento micelial de las cepas en estudio: uno en el centro y tres distribuidos equidistantemente a 3 cm de distancia alrededor del disco central. Se consideró una interacción compatible cuando se observó un crecimiento uniforme y continuo en el punto de unión entre las cepas. Por el contrario, las interacciones fueron clasificadas incompatibles si se produjo inhibición del crecimiento de una cepa sobre la otra o si no se observó desarrollo de micelio en el punto de contacto.

RESULTADOS

Recolección de muestras y aislamiento del patógeno

En el laboratorio, se obtuvieron 702 aislamientos del hongo asociado a síntomas de pudrición de corona y de raíz, se obtuvieron cultivos puros mediante la técnica de cultivos monoconidiales. El crecimiento en medio PDA mostró colonias de coloración variable entre blanco grisáceo y marrón claro, con márgenes definidos y presencia de estructuras conidiales típicas del género *Neopestalotiopsis*. En total se seleccionaron 17 cepas representativas para su caracterización morfológica y molecular.

Morfometría

El largo total de las conidias, considerando el eje comprendido desde la célula apical hasta la célula basal, varió entre 20 y 29 µm. El punto más ancho se registró en la célula media 2, con un rango de 6 a 8 µm. Los apéndices apicales mostraron una longitud variable de 9 a 28 µm, mientras que la célula apical presentó dimensiones de 3 a 6 µm. En cuanto a las células medias (1, 2 y 3), los valores oscilaron entre 3–6 µm, 4–6 µm y 4–7 µm, respectivamente. La célula basal mostró una longitud de 3 a 6 µm, y los apéndices basales variaron entre 5 y 13 µm. El análisis de 2 550 mediciones individuales permitió una caracterización de alta resolución. El índice de forma promedio fue de 3.60 ± 0.46, lo cual sitúa a los aislamientos dentro de un rango típico reportado para la especie *N. rosae*. El coeficiente de variación (12.78 %) refleja una estabilidad fenotípica considerable entre cepas, sugiriendo que las dimensiones fundamentales del conidio están bajo un fuerte control genético.

Se identificaron tres tendencias claras en el desarrollo conoidal diferenciándose 3 grupos morfológicos:

Tendencia a la elongación (Grupo E.H.): las cepas con prefijo E.H. (ej. A11, B1) presentan valores más altos del largo total y longitud de apéndices. Este morfotipo "Macromorfo" maximiza la superficie de contacto.

Tendencia a la robustez (Grupo Mar): los aislamientos de este grupo muestran una reducción en el largo pero un incremento en el ancho promedio (7.17µm), resultando conidios más elipsoidales.

Plasticidad de apéndices: la longitud de los apéndices mostró la mayor oscilación (desde 9.28 µm hasta 28.47 µm). Esta variable es la que más contribuye a la diferenciación entre cepas, lo que podría estar relacionado con diferentes capacidades de dispersión hídrica en el campo.

En la Tabla 1 podemos observar que cada valor representa el promedio de n=150 conidios por cepa. Las diferencias en el índice de forma entre el grupo E.H y los grupos IRI/Mar son estadísticamente significativas ($p<0.05$). Se nota como el grupo Mar tiene la mayor desviación en los apéndices (6.8). Esto se debe a la cepa F18, que actúa como un valor atípico por sus apéndices extremadamente cortos, lo cual es un hallazgo valioso en la diversidad intraespecífica. El grupo E.H. tiene el índice de forma más alto (3.77 µm), lo que los define visualmente como los más estilizados del estudio.

Tabla 1. Síntesis de 2 550 mediciones (17 cepas x 150 repeticiones) de *N. rosae*

Grupo de cepa	Largo promedio (µm)	Ancho promedio (µm)	Índice de forma (L/W)	Largo apéndice apical (µm)	Caracterización morfológica
E.H (A11, A17, B25, B1, A1, B22)	26.03± 3.1	6.90±0.5	3.77	22.05 ± 3.4	Macromorfo: conidios elongados y apéndices extensos
IRI (C9, C33, D43, D3, C31, D12)	24.15 ± 2.8	6.92±0.5	3.49	19.46 ± 4.2	Mesomorfo: alta variabilidad; dimensiones intermedias
Mar (E8, F25, F4, E30, F18)	25.13 ± 1.5	7.17±0.6	3.50	17.61 ± 6.8	Braquiomorfo: conidios anchos con apéndices reducidos
Promedio general	**25.26**	**7.03**	**3.60**	**20.08**	**Especie: *N. rosae***

Correlaciones alométricas

La matriz de correlación de Pearson reveló una relación positiva fuerte (r=0.88) entre el largo del conidio y la suma de sus células medias. Esto indica que el crecimiento del hongo no es aleatorio: al aumentar la talla de la espora, el hongo prioriza el desarrollo de las células pigmentadas centrales. Esta inversión en biomasa pigmentada es crucial, ya que estas células proveen protección contra la radiación UV y el estrés osmótico. Estas medidas evidencian la variabilidad morfológica característica del género *Neopestalotiopsis*, especialmente en la longitud de los apéndices y la proporción entre las células medias y la apical.

Extracción de ADN

La integridad del ADN se reporta en la Figura 2, observándose en todos los carriles una banda definida de alto peso molecular. Los resultados obtenidos reflejan un proceso de extracción altamente eficiente, fundamental para el éxito de las aplicaciones moleculares posteriores. Más allá del procedimiento técnico, la integridad del material genético se manifestó de forma clara en la electroforesis, donde la presencia de bandas definidas de alto peso molecular confirmó que el ADN no sufrió fragmentación significativa durante la lisis celular. La evaluación cuantitativa y cualitativa arrojó que los valores de concentración (60 a 4600 ng/µL) sugieren una robustez en el método, capaz de recuperar material genético incluso en muestras con densidades biológicas dispares.

La pureza optimizada mediante el índice A_{260}/A_{280} (1.5 - 2.0) se sitúa, en su mayoría, dentro del rango ideal de 1.8. Esto es crucial, ya que niveles por debajo de 1.5 suelen indicar presencia de proteínas o fenoles que actúan como inhibidores de la enzima polimerasa. Criterios establecidos por Sambrook y Russell (2012) sostienen que para técnicas de amplificación como la PCR, la pureza es a menudo más crítica que la concentración absoluta, podemos argumentar que los valores de 1.5 a 2.0 garantizan que los polisacáridos y metabolitos secundarios comunes en el estudio de hongos han sido removidos eficazmente. Esto asegura que la caracterización molecular sea reproducible y no presente falsos negativos por inhibición enzimática.

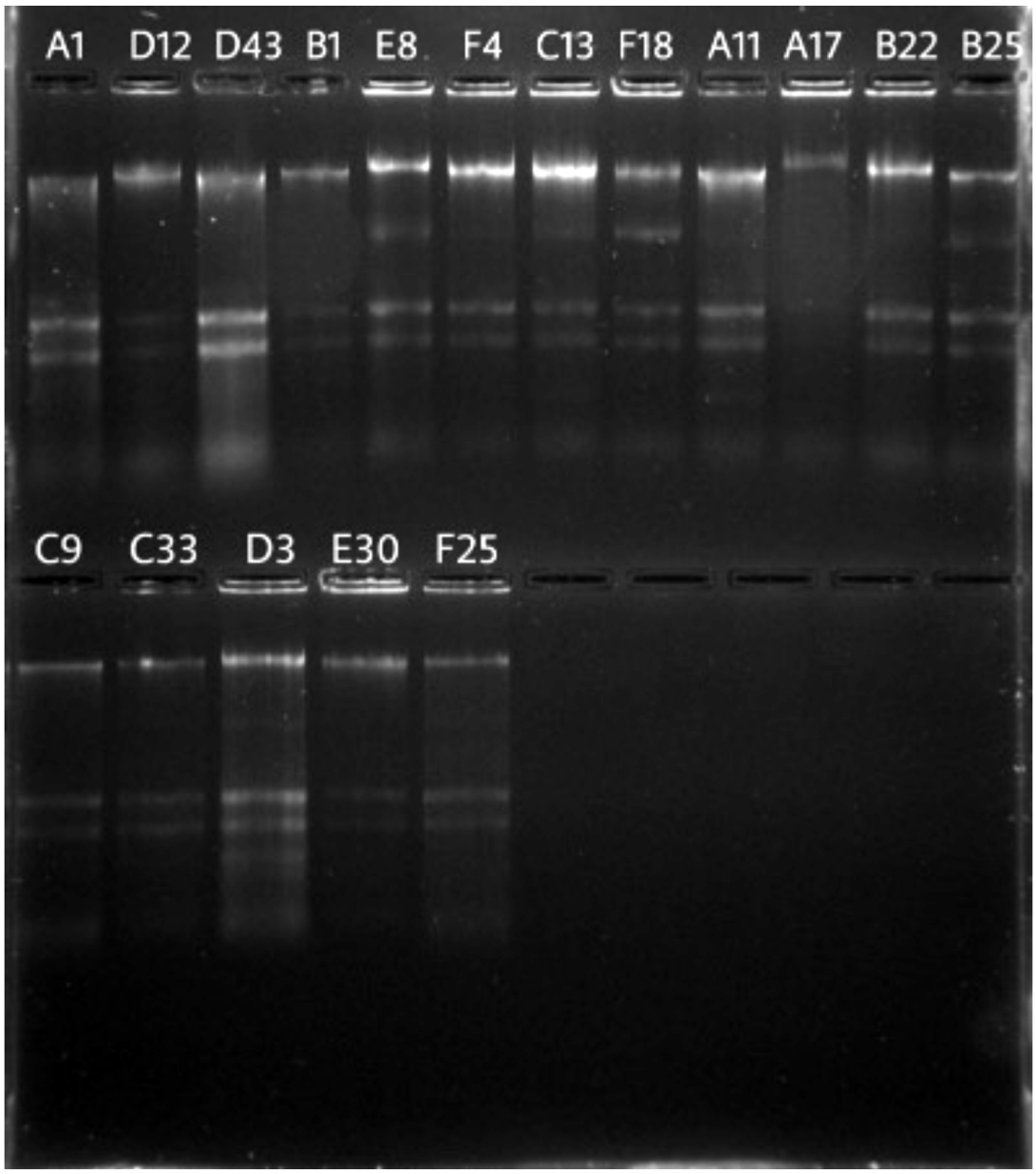


Figura 2. Visualización de ADN genómico de aislados de *Neopestalotiopsis* sp. en gel de agarosa al 3 %.

Amplificación de ITS

La amplificación de la región ITS con los cebadores universales ITS1 e ITS4 generó productos específicos de aproximadamente 600 pb en la mayoría de las cepas, los cuales fueron claramente visibles en los geles de agarosa al 1.5 %. La comparación entre las secuencias generadas en este estudio con secuencias de *Neopestalotiopsis rosae* reportadas en GenBank mostraron una similitud del 98 al 100 %. Sin embargo, debido a la alta cercanía genética entre especies del genero *Neopestalotiopsis* se consideró necesario incorporar otros marcadores moleculares para confirmar con mayor precisión la identidad taxonómica de las cepas.

Análisis filogenético basado en la región ITS

El análisis filogenético basado en las secuencias ITS1–ITS4 agrupó a los 17 aislados de *Neopestalotiopsis* dentro de un clado monofilético correspondiente a *N. rosae* (Figura 3), junto con la secuencia de refe-

rencia MN385720.1, la solidez de esta relación se confirmó con los valores soporte bootstrap obtenidos (77–92 %). Sin embargo, la formación de subclados bien definidos entre los aislados MOS1, E8, R_A1 y R_C31, indica la existencia de variabilidad genética intraespecífica, probablemente asociada a diferencias en el origen geográfico o a microevolución dentro de la población local. Aunque todas las cepas pertenecen al mismo linaje, la divergencia observada en la región ITS sugiere la presencia de posibles halotipos ITS dentro de *N. rosae*, lo que respalda la heterogeneidad genética detectada mediante los análisis de compatibilidad micelial y RAPD.

El análisis en IQ-TREE (modelo K2P+G4, 10,000 réplicas bootstrap) mostró que las cepas estudiadas se agrupan con *N. rosae* (MN385720.1), evidenciando variabilidad genética intraespecífica.

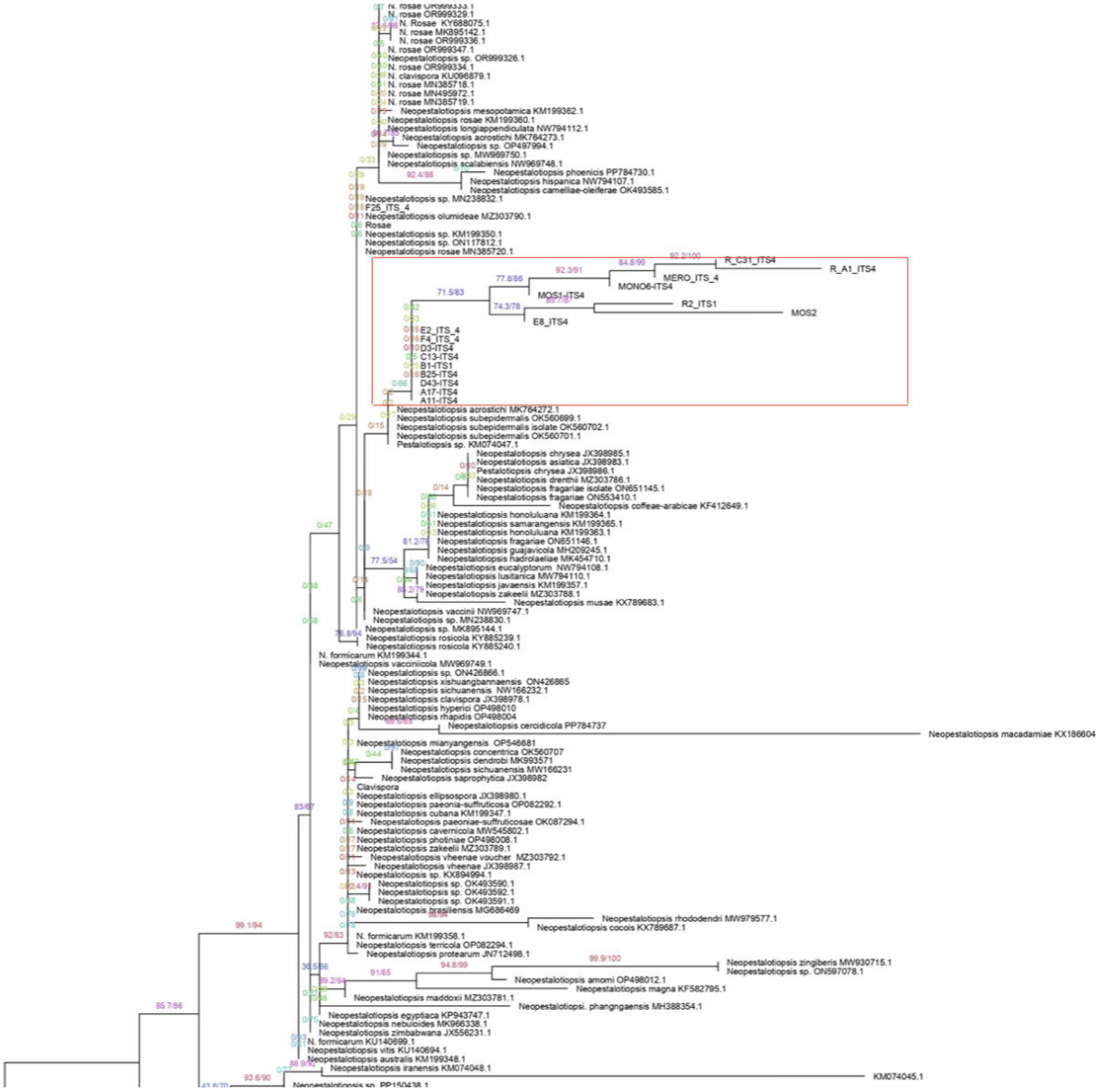


Figura 3. Árbol filogenético inferido a partir de secuencias ITS1–ITS4 de *Neopestalotiopsis* spp. de fresa en Michoacán. El análisis en IQ-TREE (modelo K2P+G4, 10,000 réplicas bootstrap) mostró que las cepas estudiadas se agrupan con *N. rosae* (MN385720.1), evidenciando variabilidad genética intraespecífica.

Amplificación RADP´s

La amplificación de las 17 cepas se obtuvo con todos los iniciadores evaluados, destacando las combinaciones P23/P30 y P31/P35 por generar la mayor cantidad de fragmentos amplificados (Figura 4), en contraste con el iniciador P2, que al emplearse de manera individual produjo el menor número de fragmentos.

Los iniciadores evaluados mostraron una alta capacidad para diferenciar las cepas analizadas, con porcentajes de polimorfismo superiores al 90 % en la mayoría de los casos (Tabla 2). Los marcadores 23, 30 y 2 presentaron el 100 % de fragmentos polimórficos, evidenciando su alta eficiencia para discriminar genotipos, mientras que el marcador 31 mostró el menor nivel de polimorfismo (85.71 %). En conjunto, estos resultados indican una elevada diversidad genética en las poblaciones estudiadas y confirman la utilidad de los iniciadores seleccionados para estudios de variabilidad intraespecífica.

Los valores del Coeficiente de Información Polimórfica (PIC) se ubicaron entre 0.3052 y 0.3814, con un promedio de 0.3551, mientras que el índice de diversidad de Shannon fluctuó entre 46.17 % y 55.99 %, alcanzando una media de 52.37 % (Tabla 2). Con base en estos resultados, los iniciadores P2 y P30 demostraron ser los más eficientes para detectar variabilidad genética, en contraste con la combinación P23/P30, que presentó el menor poder de resolución (Tabla 3).

El dendrograma (Figura 5), generado a partir de la matriz de similitud de Dice, reveló la formación de cinco grupos principales. El grupo 1 estuvo integrado por las cepas A1 y D12; el grupo 2 por D43, B1, E8, F4, C13, F18 y A11; el grupo 3 únicamente por la cepa A17; el grupo 4 por B22, B25 y F26; y el grupo 5 por C9, C33, D3 y E30.

El dendrograma resultante indica la presencia de al menos cinco variantes genéticas de *Neopestalotiopsis* spp. en la zona productora de fresa de Michoacán, ya que algunas cepas presentan valores de similitud superiores al 90 % e incluso del 100 %, lo que evidencia cepas genéticamente idénticas. Sin embargo, el número real de variantes podría ser mayor, dado que en ciertos grupos los valores de similitud son inferiores al 80 %.

El Análisis de Coordenadas Principales (ACP) (Figura 6) respaldó la agrupación observada en el dendrograma, mostrando nuevamente cinco grupos principales. Aun así, algunos subgrupos registraron similitudes menores al 90 %, lo que sugiere la posible existencia de una diversidad genética más amplia dentro de las cepas analizadas.

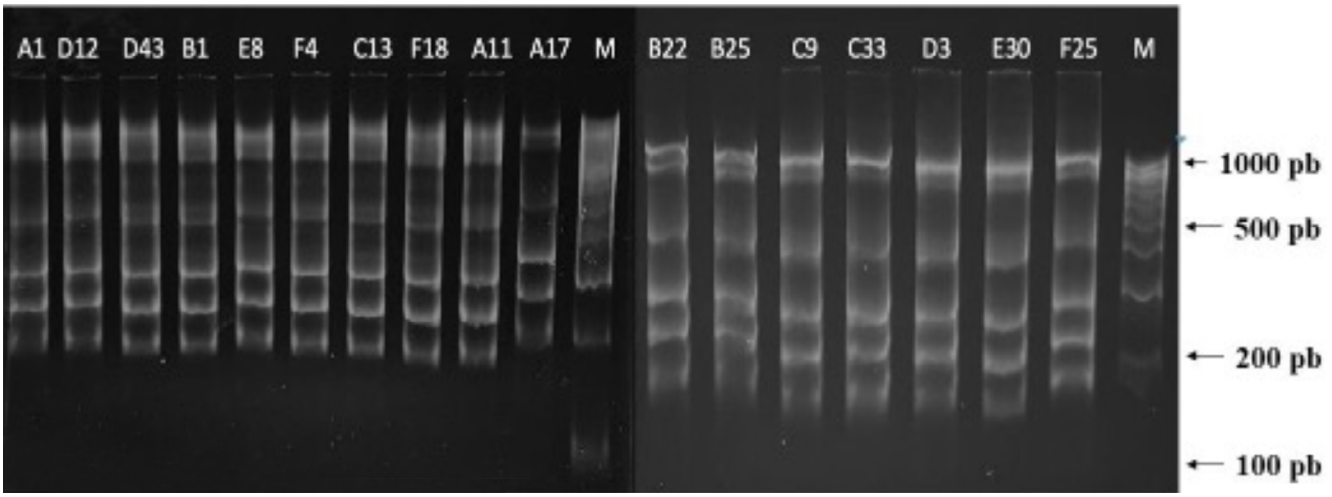


Figura 4. Perfil electroforético en geles de acrilamida obtenido con los iniciadores P31/P35 y ADN de diferentes cepas del hongo *Neopestalotiopsis* sp., aislado de muestras de fresa colectadas en el estado de Michoacán.

Tabla 2. Número de fragmentos, fragmentos polimórficos y % de polimorfismo por iniciador (individuales y mezclados)

Marcador	Número de fragmentos	Fragmentos polimórficos	% de polimorfismo
23	17	17	100.00
30	16	16	100.00
23/30	20	19	95.00
2	9	9	100.00
31	7	6	85.71
31/35	16	15	93.75

Tabla 3. Información sobre el PIC promedio por iniciador e índice de Shannon promedio por iniciador

Iniciador	PIC	Índice de Shannon
23	0.3664	0.5447
30	0.3702	0.5467
23/30	0.3052	0.4617
2	0.3814	0.5599
31	0.3539	0.5076
3135	0.3538	0.5218

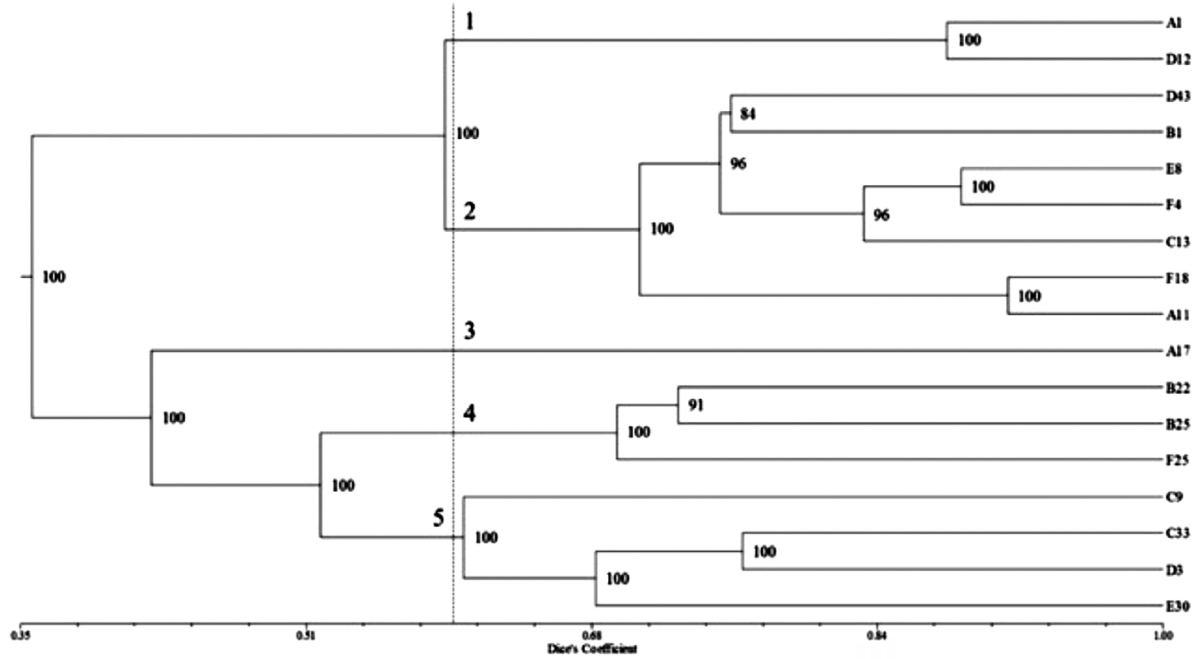


Figura 5. Relaciones genéticas de 17 cepas de *Neopestalotiopsis* spp. recolectadas en distintas localidades del estado de Michoacán, obtenidas mediante el coeficiente de Nei-Li a partir de los datos generados con cinco marcadores RAPD aplicados de manera individual y combinada. Los cinco grupos formados se señalan con los números 1, 2, 3, 4 y 5.

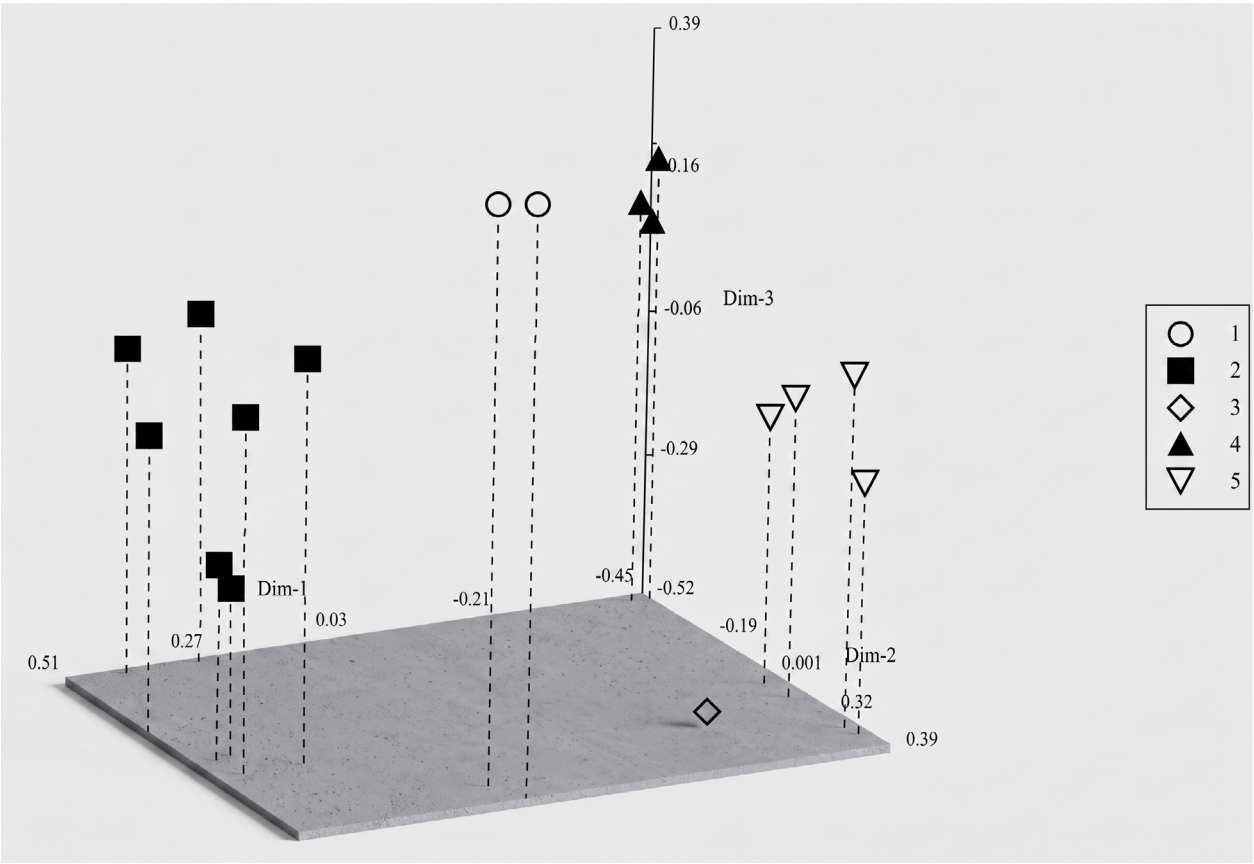


Figura 6. Análisis de Coordenadas Principales (ACP) de los aislamientos de *Neopestalotiopsis* basado en los perfiles de amplificación obtenidos.

Compatibiliadad micelial

Del total de interacciones analizadas en las pruebas de compatibilidad micelial, se observó que las cepas pertenecientes al grupo A1 mostraron un comportamiento mayoritariamente compatible (Figura 7), estableciendo uniones estables con la mayoría de las cepas evaluadas. Sin embargo, se detectó incompatibilidad en su interacción con las cepas A17 y E30, en las cuales se evidenció una barrera de reconocimiento que impidió la fusión de hifas. Este patrón sugiere que A1 podría constituir un grupo de compatibilidad relativamente amplio, pero con ciertos límites frente a cepas específicas.

Por el contrario, el resto de las cepas (A11, F4, F18, D12, A17, B22, C13, F25, B25, B1, E8, E30, D43, C9, D3 y C33) presentaron interacciones incompatibles en la mayoría de los enfrentamientos (Figura 8), caracterizadas por zonas de inhibición del crecimiento o ausencia de anastomosis en el punto de contacto. Estos resultados indican que la población analizada se encuentra conformada principalmente por cepas que pertenecen a distintos grupos de compatibilidad micelial (VCGs), lo cual refleja una marcada heterogeneidad genética.

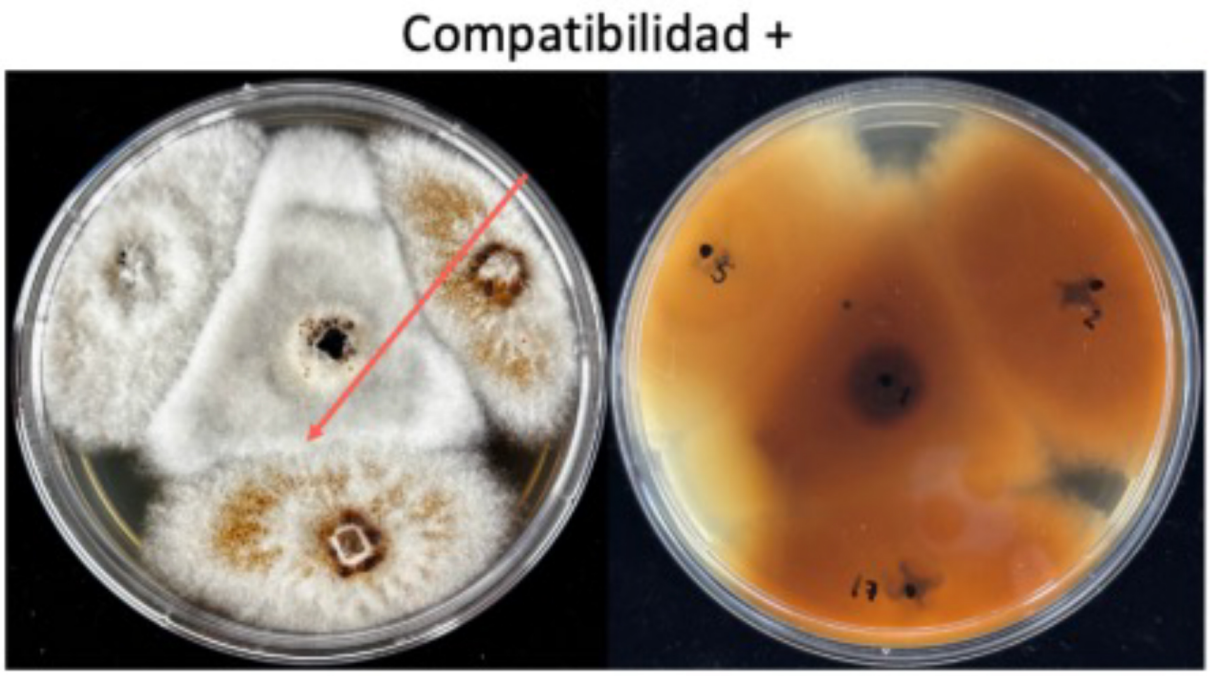


Figura 7. Interacciones miceliales entre aislamientos de *Neopestalotiopsis*, evidenciando reacciones de compatibilidad entre cepas.

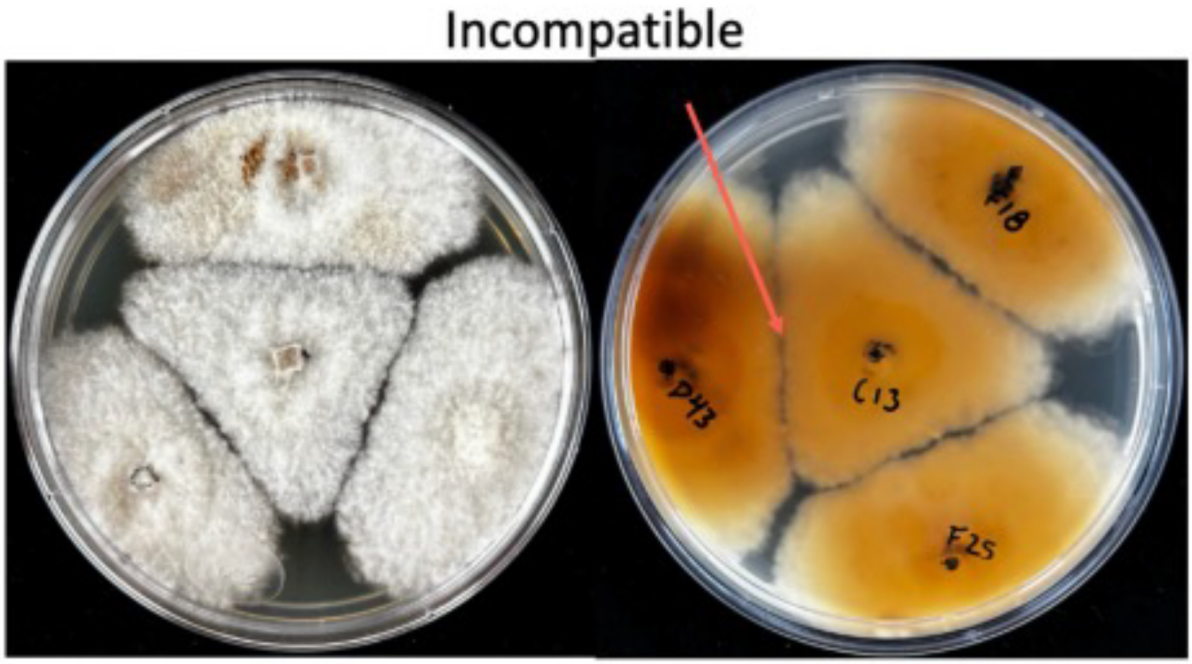


Figura 8. Interacciones miceliales entre aislamientos de *Neopestalotiopsis*, evidenciando reacciones de incompatibilidad entre cepas.

DISCUSIÓN

La variación observada en las 17 cepas sugiere diferentes estrategias de colonización en el campo: Las cepas con índices de forma altos (Q>3.7) y apéndices apicales largos son morfológicamente aptas para la dispersión por salpicadura de lluvia. Los apéndices largos actúan como paracaídas biológicos que aumentan la resistencia al aire, permitiendo que la espora viaje más lejos en las microgotas de agua antes de depositarse en hojas sanas. Los conidios más anchos y robustos del grupo Mar, aunque tienen apéndices más cortos, poseen una mayor superficie de contacto basal. Esto podría favoreces una adhesión más firme a la cutícula cerosa de la hoja de fresa. Además, un mayor volumen citoplasmático (ancho superior) se asocia con una mayor reserva de nutrientes para la formación del tubo germinativo en condiciones de baja humedad. Las cepas con apéndices largos (como la cepa B1) suelen ser más eficientes colonizando al follaje, ya que los apéndices ayudan a anclarse entre los tricomas de la hoja de fresa. Las cepas más compactas (como la cepas D12 o F18) podrían ser transportadas más fácilmente por el agua de riego hacia el cuellos de la planta, contribuyendo a la pudrición de la corona, una de las más severas de la enfermedad descrita por Baggio *et al*. (2021).

La emergencia de *N. rosae* como un patógeno limitante en el cultivo de fresa (Baggio *et al*. 2021) resalta la necesidad de entender la diversidad morfológica de los aislamientos locales. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las cepas de fresa presentan una estabilidad estructural que coincide con los reportes de Ayoubi *et al*. (2016), reforzando la identidad taxonómica de los brotes analizados.

El análisis filogenético basado en las secuencias ITS1–ITS4 agrupó las 17 cepas dentro de un clado monofilético correspondiente a *Neopestalotiopsis rosae*, junto con la secuencia de referencia MN385720.1, con valores de soporte bootstrap robustos (77–92 %). Sin embargo, la presencia de subclados bien definidos entre aislados MOS1, E8, R_A1 y R_C31 evidencia una variabilidad genética intraespecífica, probablemente relacionada con diferencias geográficas o procesos de microevolución local. Este tipo de variación es consistente con lo reportado en otros hongos fitopatógenos, donde la región ITS se ha utilizado con éxito para diferenciar especies estrechamente rela-

cionadas y detectar linajes divergentes. Dicha región, ha sido empleada en estudios taxonómicos y filogenéticos, permite además inferir relaciones intraespecíficas y patrones de diversidad genética asociados a la patogenicidad o adaptación ecológica (Merseguel *et al.* 2015, Nilsson *et al.* 2008, Rampersad 2014).

El uso de marcadores RAPD permitió obtener amplificaciones consistentes en las 17 cepas de *Neopestalotiopsis* spp. estudiadas. El hecho de que todos los iniciadores generaran productos de amplificación confirma que la técnica fue adecuada para este grupo de hongos. Resultados similares se han descrito para hongos fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum*, *Lasiodiplodia theobromae, F. solani*. En estos estudios, el uso de 15 iniciadores permitió detectar altos niveles de polimorfismo, alcanzando hasta un 83 % en el caso de *F. oxysporum* (Kumari *et al.* 2014). Así mismo, Khan *et al.* (2025) evaluaron la diversidad genética de *Curvularia lunata* mediante el uso combinado de marcadores ISSR, URP y RAPD. Todos los sistemas mostraron un 100 % de polimorfismo, sin embargo, los marcadores RAPD generaron el mayor número de bandas (66) y presentaron el valor más alto de contenido de información polimórfica (PIC = 0.89). Los marcadores moleculares basados en la técnica de PCR como lo es RAPD son comúnmente usados para los estudios de diversidad genética fúngica y sigue siendo una alternativa viable para el estudio de diversos patógenos frente a MPS en estudios con recursos limitados (Oliveira y Azevedo 2022)

Los valores de PIC obtenidos (0.3052–0.3814; media = 0.3551) reflejan un nivel moderado de polimorfismo, lo que sugiere que los marcadores RAPD aplicados fueron adecuados para distinguir la variación genética entre las cepas. Resultados similares fueron reportados por Zafar *et al.* (2025) en su estudio con *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium solani* y *F. oxysporum*, reportaron que los valores de PIC alcanzaron hasta 0.416, lo que demuestra la utilidad de los marcadores RAPD para evaluar la diversidad genética en hongos patógenos. Por otro lado, Patel *et al.* (2018) registraron un valor promedio de PIC de 0.705 (2018), en *Colletotrichum falcatum*, al combinar marcadores RAPD e ISSR, lo que evidencia que el uso conjunto de diferentes tipos de marcadores puede aumentar la resolución en los estudios de variabilidad genética. Las diferencias entre ambos estudios pueden explicarse por el tipo de marcador empleado, la cantidad de loci amplificados o las particularidades biológicas de cada organismo. Además, procesos como la recombinación sexual y las mutaciones espontáneas contribuyen a generar una mayor diversidad genotípica en las poblaciones fúngicas.

El índice de diversidad de Shannon obtenido en este estudio (46.17–55.99 %, media = 52.37 %) refleja un nivel moderado de diversidad genética entre las cepas de *Neopestalotiopsis*. Este resultado sugiere que, si bien existe una variabilidad apreciable dentro de la población analizada, la estructura genética podría estar condicionada por un origen común o por una dispersión limitada entre los sitios de muestreo.

Por, ejemplo, en el caso de *Histoplasma capsulatum,* Sahaza *et al.* (2019) aplicaron análisis RAPD-PCR para estudiar la estructura poblacional y encontraron que el índice de Shannon fue un indicador clave para detectar diferencias genéticas relacionadas con el origen geográfico de las cepas. Sus resultados demostraron que este parámetro es útil para revelar patrones de diversidad y estructuración genética en hongos patógenos, respaldando su uso en estudios similares.

De manera comparable, Wang *et al.* (2025) reportaron valores de diversidad genética relativamente bajos en poblaciones de *Thuja koraiensis*, donde el índice de Shannon varió entre 0.0462 y 0.2614, con una media de 0.1687. Dichos autores observaron que la diversidad genética entre poblaciones era ligeramente superior a la registrada dentro de ellas, lo que sugiere un flujo génico restringido y cierta diferenciación geográfica. En el caso de *Neopestalotiopsis*, la tendencia a una diversidad moderada podría indicar un patrón similar, en el que las poblaciones mantienen cierta conectividad genética, pero con un grado de aislamiento suficiente para generar variación entre las cepas de diferentes procedencias.

En el mismo sentido, los resultados de compatibilidad micelial evidenciaron una alta heterogeneidad dentro de la población de *Neopestalotiopsis* spp., lo que indica la existencia de varios grupos de compatibilidad vegetativa. Este tipo de agrupación suele estar relacionado con diferencias genéticas entre los individuos, ya que los MCG reflejan la estructura poblacional. En estudios con *Sclerotinia sclerotiorum*, por ejemplo, se ha demostrado una estrecha relación entre los MCG y los linajes multilocus, donde gran parte de la variación genética se explicó por las diferencias entre los grupos de compatibilidad (Silva *et al.*

2021). En otro estudio realizado por Cota-Barreras *et al.* (2022) en poblaciones de *Macrophomina phaseolina* aisladas de garbanzo en México pudieron identificar seis grupos de compatibilidad micelial, a pesar de que todos los aislados correspondieron a la misma especie según análisis moleculares. Este resultado evidencia que, aún dentro de una misma especie, pueden existir diferencias genéticas reflejadas en los patrones de compatibilidad micelial. Por lo tanto, la variabilidad observada entre los aislados de *Neopestalotiopsis* spp. podría interpretarse como un indicador de diversidad genética intrapoblacional, lo que respalda la utilidad de las pruebas de compatibilidad como herramienta para inferir la estructura genética de las poblaciones fúngicas.

Los resultados de este estudio demuestran que las poblaciones de *Neopestalotiopsis* spp. presentan una diversidad genética moderada, sustentada tanto por los marcadores moleculares como por los patrones de compatibilidad micelial. Estos hallazgos aportan una base sólida para comprender la dinámica poblacional del patógeno y pueden contribuir al diseño de estrategias de manejo más efectivas, así como a futuras investigaciones sobre su evolución y adaptación en diferentes hospedantes.

CONCLUSIONES

Las mediciones morfométricas mostraron diferencias en el tamaño y proporción de las conidias, lo que refleja variación morfológica entre las cepas.

Los análisis con ITS, marcadores RAPD y las pruebas de compatibilidad micelial revelaron una diversidad genética moderada, indicando que las poblaciones no son completamente uniformes. Esta variabilidad podría estar relacionada con la reproducción asexual del hongo y con mutaciones ocasionales que generan nuevos genotipos.

En conjunto, los resultados ofrecen una primera aproximación a la caracterización morfológica y genética de *Neopestalotiopsis* spp., y proporcionan una base sólida para futuros estudios que profundicen en su delimitación taxonómica y su papel en la patogenicidad.

LITERATURA CITADA

Acosta-González U, Leyva-Mir SG, Silva-Rojas HV, Rebollar-Alviter A. 2024. Preventive and curative effects of treatments to manage strawberry root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis rosae*. Plant Disease 108 (5), 1278-1288. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-23-0958-RE

Ayoubi N, Soleimani MJ. 2016. Strawberry fruit rot caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov., and *N. mesopotamica*. Current Microbiology 72, 329-336. https://doi.org/10.1007/s00284-015-0955-y

Baggio JS, Forcelini BB, Wang NY, Ruschel RG, Mertely JC, Peres NA. 2021. Outbreak of leaf spot and fruit rot in Florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. Plant Disease 105, 305-315. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1290-RE

Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiology 10, 189. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189

Chamorro M, Aguado A, De los Santos B. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. Plant Disease 100, 1495. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN

Cervantes-Zúñiga MM, Hernández-Juárez A, Gallegos-Morales G, Delgado-Ortiz JC, Castro-del Ángel E. 2025. Diagnóstico y control de *Neopestalotiopsis rosae* Maharachch., KD Hyde & Crouses en cultivos hortícolas. Revista Mexicana de Agroecosistemas 12 (3), 198-212. https://doi.org/10.60158/zke3ve03

Collado-Romero M, Mercado-Blanco J, Olivares-García C, Valverde-Corredor A, Jiménez-Díaz RM. 2006. Molecular variability within and among *Verticillium dahlia* vegetative compatibility groups. Phytopathology 96, 1224-1235. https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1224

Cota-Barreras CI, García-Estrada RS, Valdez-Torres JB, León-Félix J, Valenzuela-Herrera V, Tovar-Pedraza JM. 2022. Molecular detection, virulence, and mycelial compatibility of *Macrophomina phaseolina* isolates associated with chickpea wilt in Sinaloa and Sonora, Mexico. Canadian Journal of Plant Pathology 44, 849-857. https://doi.org/10.1080/07060661.2022.2084642

Earnshaw D, Boland GJ. 1997. Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathology 46, 229-238. https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-13.x

Fiorenza A, Gusella G, Aiello D, Polizzi G, Voglmayr H. 2022. *Neopestalotiopsis siciliana* sp. nov. and *N. rosae* Causing stem lesion and dieback on avocado plants in Italy. Journal of Fungi 8 (6), 562. https://doi.org/10.3390/jof8060562

Gilardi G, Bergeretti F, Gullino ML, Garibaldi A. 2019. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry in Italy. Plant Disease 103, 2959. https://doi.org/10.1094/pdis-03-19-0673-pdn

Gower, J.C. 2005. Principal coordinates analysis. In: P. Armitage & T. Colton (ed.) Encyclopedia of biostatistics, 6, Chichester: John Wiley & Sons. https://doi.org/10.1002/0470011815.b2a13070

Hampl V, Pavlíček A, Flegr J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 731-735.

Hidrobo-Chavez J, Ramírez-Villacís DX, Barriga-Medina N, Herrera K, León-Reyes A. 2022. First report of *Neopestalotiopsis mesopotamica* causing root and crown rot on strawberry in Ecuador. Plant Disease 106, 1066. https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1278-PDN

Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. Molecular Biology and Evolution 35, 518-522. https://doi.org/10.1093/molbev/msx281

Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nature Methods 14, 587-589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285

Katoh K, Standley DM. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30, 772-780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010

Keith LM, Velasquez ME, Zee FT. 2006. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. Plant Disease 90, 16-23. https://doi.org/10.1094/PD-90-0016

Kermani F, Shams-Ghahfarokhi M, Gholami-Shabani M, Razzaghi-Abyaneh M. 2016. Diversity, molecular phylogeny and fingerprint profiles of airborne *Aspergillus* species using random amplified polymorphic DNA. World Journal of Microbiology and Biotechnology 32, 96. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2052-1

Khan MFA, Riaz A, Ahsan R, Ahmad I, Ullah S, Raza A, Zakri M. 2025. Genetic variability among isolates of *Curvularia lunata* and *Exserohilum rostratum* causing brown leaf spot of rice from Pakistan. Current Microbiology 82, 436. https://doi.org/10.1007/s00284-025-04425-5

Kumari N, Thakur SK. 2014. Randomly amplified polymorphic DNA – a brief review. American Journal of Animal and Veterinary Sciences 9, 6-13. https://doi.org/10.3844/ajavssp.2014.6.13

Lawrence DP, Brittain GD, Aglave B, Sances FV. 2023. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing crown and root rot of strawberry in California. Plant Disease 107, 566. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-22-0871-PDN

Machín A, González P, Vicente E, Sánchez M, Estelda C, Ghelfi J, Silvera-Pérez E. 2019. First report of root and crown rot caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on strawberry in Uruguay. Plant Disease 103, 2946. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0948-PDN

Maharachchikumbura SS, Guo LD, Chukeatirote E, Bahkali AH, Hyde KD. 2011. *Pestalotiopsis* -morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity 50, 167-187. https://doi.org/10.1007/s13225-011-0125-x

Maharachchikumbura SS, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J, Crous PW. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. Studies in Mycology 79, 121-186. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005

Merseguel KB, Nishikaku AS, Rodrigues AM, Padovan AC, e Ferreira RC, de Azevedo Melo AS, Briones MR, Colombo AL. 2015. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. BMC Infectious Diseases 15, 57. https://doi.org/10.1186/s12879-015-0793-3

Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Molecular Biology and Evolution 32, 268-274. https://doi.org/10.1093/molbev/msu300

Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Science 76, 5269-5273. https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269

Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom *Fungi* as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. Evolutionary Bioinformatics 4, 193-201. https://doi.org/10.4137/EBO.S653

Núñez-Colín CA, Escobedo-López D. 2014. Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. Acta Agrícola y Pecuaria 1(1): 1-6. https://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/1

Obregón VG, Meneguzzi NG, Ibañez JM, Lattar TE, Kirschbaum DS. 2018. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing root and crown rot on strawberry plants in Argentina. Plant Disease 102, 1856. https://doi.org/10.1094/PDIS-02-18-0330-PDN

Olivares-Rodríguez G, Ángeles-Núñez JG, Mondragón-Rojas F, Rivas-Valencia P, Zárate-Castrejón JL, Mariscal-Amaro LA, Díaz-Espino LF, Martínez-Martínez TO. 2024. Control *in vitro* de *Neopestalotiopsis* sp. aislada de fresa empleando *Trichoderma* y fungicidas comerciales. Revista Mexicana de Fitopatología 42, 52. https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2024-28

Oliveira M, Azevedo L. 2022. Molecular markers: An overview of data published for fungi over the last ten years. Journal of Fungi 8, 803. https://doi.org/10.3390/jof8080803

Orona-Castro F, Pecina-Quintero V, Rocha-Peña MA, Parga-Torres V M., Martínez de la Vega O, Almeyda-León I H. 2004. Caracterización de variedades y líneas elite de papa (*Solanum tuberosum* L.) en México utilizando marcadores RAPD y SSR. Python 2004:289-300. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572004000100035

Patel P, Rajkumar BK, Parmar P, Shah R, Krishnamurthy R. 2018. Assessment of genetic diversity in *Colletotrichum falcatum* Went

accessions based on RAPD and ISSR markers. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 16, 153-159. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.11.006

Peña-Caballero V, Morales-Vargas AT, Núñez-Colín CA. 2020. Eigenanálisis aplicado a diferentes áreas de las ciencias agrícolas y biotecnología: una revisión. Acta Agrícola y Pecuaria 6: e0061009. https://doi.org/10.30973/aap/2020.6.0061009

Raeder U, Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 1, 17-20. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x

Rakhonde GY, Supriya ML, Sriram S. 2025. First report of the association of *Neopestalotiopsis javaensis* causing leaf spot and fruit rot of strawberry in the southern part of India. Indian Phytopathology 78, 487-492. https://doi.org/10.1007/s42360-025-00863-0

Rambaut A. 2016. FigTree v1.4.4. http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/ (Accessed March 2025).

Rampersad SN. 2014. ITS1, 5.8S and ITS2 secondary structure modelling for intra-specific differentiation among species of the *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato species complex. SpringerPlus 3, 684. https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-684

Roldán-Ruiz I, Dendaum J, Van Bockstaele E, Depicker A, De Loose M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). Molecular Breeding 6: 125-134. https://link.springer.com/article/10.1023/A:1009680614564.

Rolfh, F.J. 2005. NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.2. Getting started guide. Exeter software. New York, USA.

Rebollar-Alviter A, Silva-Rojas HV, Fuentes-Aragón D, Acosta-González U, Martínez-Ruiz M, Parra-Robles BE. 2020. An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. Plant Disease 104, 2054-2059. https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2493-SC

Sahaza JH, Duarte-Escalante E, Canteros C, Rodríguez-Arellanes G, Reyes-Montes MR, Taylor ML. 2019. Analyses of the genetic diversity and population structures of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Mexico, Guatemala, Colombia and Argentina, using a randomly amplified polymorphic DNA-PCR assay. Epidemiology and Infection 147, e204. https://doi.org/10.1017/S0950268819000931

Sambrook JS, Russell GD. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed. cold spring Harbor, N.Y: cold spring harbor Laboratory press. Print.

Schierling TE, Voegele RT, El-Hasan A. 2024. First report on the emergence of *Neopestalotiopsis rosae* as a severe economic threat to strawberry production in Germany. Microorganisms 13, 6. https://doi.org/10.3390/microorganisms13010006

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, White MM. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 6241-6246. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2024. Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, México. https://nube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/ (Accessed August 2025).

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2022. Monitor fitosanitario. https://dj.senasica.gob.mx/AnalisisSanitario/ (Accessed August 2025).

Shannon CE. 1948. A Mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal 27, 379-423. http://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x

Shi J, Zhang X, Liu Y, Zhang Z, Wang Z, Xue C, Ma Y, Wang F. 2022. First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing calyx and receptacle blight on strawberry in China. Plant Disease 106, 1307. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-21-1376-PDN

Silva RA, Ferro CG, Lehner MDS, Paula TJ Jr, Mizubuti ES. 2021. The population of *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil is structured by mycelial compatibility groups. Plant Disease 105, 3376-3384. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0110-RE

Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular biology and evolution 38, 3022-3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I, Perez-Brito D. 2013. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). European Journal of Plant Pathology 135, 67-79. https://doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7

Valencia-Ledezma OE, Castro-Fuentes CA, Duarte-Escalante E, Frías-De-León MG, Reyes-Montes MDR. 2022. Selection of polymorphic patterns obtained by RAPD-PCR through qualitative and quantitative analyses to differentiate *Aspergillus fumigatus*. Journal of Fungi 8, 296. https://doi.org/10.3390/jof8030296

Wang J, Zhang Y, Wang R, Lan X, Yuan J, Yu Z, Du F. 2025. RAPD analysis of genetic diversity in *Thuja koraiensis* Nakai population. Revista Árvore 49, e4929. https://doi.org/10.53661/1806-9088202549263914

White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 18 (1), 315-322.

Wu HY, Tsai CY, Wu YM, Ariyawansa HA, Chung CL, Chung PC. 2021. First report of *Neopestalotiopsis rosae* causing leaf blight and crown rot on strawberry in Taiwan. Plant Disease 105, 487. https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1045-PDN

Zafar UB, Rana IA, Khan SHU, Atif RM. 2025. Molecular characterization of shisham dieback-associated fungal isolates across the Punjab Province, Pakistan. Asian Journal of Agriculture and Bio-

logy 2025, 2024153. https://doi.org/10.35495/ajab.2024.153

Zhang YZ, Li Z, Man J, Xu D, Wen L, Yang C, Xu Q, Jiang QT, Chen GY, Deng M, Peng YL, Zhong K, Qi PF, Wei YM. 2023. The genetic diversity of field isolates of *Fusarium asiaticum* and *Fusarium graminearum* increases the risk of fungicide resistance. Phytopathology Research 5, 51. https://doi.org/10.1186/s42483-023-00206-9