

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



**ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y MICROBIOLÓGICO DE
HONGOS PRESENTES EN FRUTOS DE DÁTIL
(*Phoenix dactylifera* L.)**

T E S I S

COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO

PRESENTA

ODALIS AYLIN PACHECO PRECIADO

DIRECTOR

DR. RAÚL ENRIQUE VALLE GOUGH

Ejido Nuevo León, Mexicali, B.C.

Noviembre de 2024

**Análisis bioinformático y microbiológico de hongos
presentes en frutos de dátil (*Phoenix dactylifera*)**

TESIS

**Sometida a la consideración del programa de Ingeniero Biotecnólogo
Agropecuario**

Del

Instituto de Ciencias Agrícolas

Por

Odalís Aylin Pacheco Preciado

Ejido Nuevo León, Mexicali, B.C.

Noviembre de 2024

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DEL COMITÉ DE TESIS, APROBADA Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO

COMITÉ DE TESIS:

Director _____

Dr. Raúl Enrique Valle Gough

Sinodal _____

Dra. Blancka Yesenia Samaniego Gámez

Sinodal _____

Dra. Belém Dolores Avendaño Ruíz

AGRADECIMIENTOS:

Primeramente, agradezco a Dios y a mis papas por siempre estar para mí y apoyarme incondicionalmente. Agradezco a mis asesores de tesis, el Dr. Raúl Enrique Valle Gough, la Dra. Blancka Yesenia Samaniego Gámez, por el apoyo brindado durante todo este tiempo, por siempre estar atentos a mis dudas, gracias por su paciencia. Al programa que forma parte el PROYECTO AISLAMIENTO Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN ESPECIES FRUTÍCOLAS DE BAJA CALIFORNIA (CLAVE 200/3316), A la Dra. Belem Dolores Avendaño Ruiz, por la beca otorgada que forma parte del programa 303/7/C/153/7 FORTALECIMIENTO DE CAPACIDADES EN LA COMUNIDAD PARA MITIGAR EL IMPACTO NEGATIVO DE LA PANDEMIA POR COVID-19 EN LAS FAMILIAS DE TIJUANA, B.C. Muchas gracias a todos aquellos que siempre me motivaron para seguir adelante y nunca rendirme.

DEDICATORIA:

A mis padres, por todo el apoyo, esfuerzo y por siempre motivarme para cumplir todas mis metas y por todo el amor y cariño que me han brindado a lo largo de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Botánica del cultivo de <i>Phoenix dactylifera</i> L.....	5
2.2 Desarrollo del fruto de palma datilera	6
2.3 Cultivo de palma datilera	7
2.4 Polinización.....	7
2.5 Manejo del racimo	7
2.6 Riego	8
2.7 Propagación.....	8
2.8 Patógenos en dátil	11
2.9 Métodos de Identificación	12
2.9.1 Microbiología clásica	12
2.9.2 Marcadores enzimáticos.....	13
2.9.3 Marcadores moleculares	16
3 JUSTIFICACIÓN	18
4 OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	20
6.1 Colección de muestra de dátiles en el Valle de Mexicali	21
6.2 Aislamiento fúngico, identificación morfológica y molecular	21
6.3 Pruebas de patogenicidad	22
6.4 Secuenciación de ADN y análisis filogenéticos	23
7. RESULTADOS.....	24
9. CONCLUSIONES	29

10. REFERENCIAS 30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Componentes de reacción de PCR para la amplificación de la región ITS.....	22
Cuadro 2. Resultados de la búsqueda en el NCBI de las secuencias ITS de aislados fúngicos en frutos de <i>P. dactylifera</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Descripción botánica de palma datilera (Alotaibi <i>et al.</i> , 2023).	5
Figura 2. Etapas de desarrollo del fruto de dátil (Al-Alawi <i>et al.</i> , 2017).....	6
Figura 3. Propagación de <i>P. dactylifera</i> mediante plántula (Kharzhevskaya, 2021).	9
Figura 4. Micropropagación <i>in vitro</i> de <i>P. dactylifera</i> . (a) Espata floral. (b) Diferentes tipos de explantes. (c) Formación de yemas adventicias. (d) Multiplicación de yemas. (e) Alargamiento. (f) Enraizamiento. (g) Aclimatación de las plántulas. (h) Plántulas en condiciones de invernadero (Almusawi <i>et al.</i> , 2017).	10
Figura 5. Esquema de los diferentes ensayos de tipo ELISA (Ramirez <i>et al.</i> , 2022).	15
Figura 6. Diagrama experimental para la identificación molecular de hongos aislados en frutos de <i>P. dactylifera</i>	20
Figura 7. Síntomas de la enfermedad del moho negro causado por <i>Aspergillus</i> en frutos de palmera datilera (<i>Phoenix dactylifera</i>) del Valle de Mexicali. (a) Fruto sano en estado de Tamar; (b) Síntomas de la enfermedad del moho negro en los dátiles; (c) fruto asintomático en prueba de patogenicidad; (d) Síntomas de moho negro en dátiles usando inoculaciones artificiales con aislamientos de <i>Aspergillus</i> spp. obtenidos de cultivo; (e) Hifas y conidióforos de placas PDA (40x); F) Cabeza conidial globosa marrón-negra y conidios (100x).	24
Figura 8. Análisis filogenético de aislados fúngicos en frutos de <i>P. dactylifera</i> var Medjool. A) Filogenia de secuencias ITS de aislados del género <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> . B) Filogenia de secuencias ITS de aislados del género <i>Wallemia</i>	26

RESUMEN

La palma datilera (*Phoenix dactylifera*) es un cultivo representativo de regiones áridas a nivel mundial, en México los principales productores son los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora donde se cultivan las variedades Medjool y Deglet Noor.

Debido al potencial de exportación de los frutos de dátil las áreas dedicadas al monocultivo de esta especie han aumentado, principalmente en el Valle de Mexicali, Baja California, esto ha conllevado a un incremento en la incidencia de plagas y enfermedades, lo cual pone en riesgo la producción, exportación y al consumidor final. Adicionalmente debido a la cercanía con regiones productoras de dátil en Arizona y California, se puede favorecer la propagación de plagas y enfermedades.

En el presente estudio se recolectaron frutos de dátiles en cuatro zonas de producción en Mexicali, Baja California, y se observaron las principales características macroscópicas (color, forma y tipo de colonia) y microscópicas (forma de esporas, cabeza de conidio y conidióforo) de cada uno de los aislados. y se realizó la identificación molecular. Los microorganismos asociados a los frutos de *Phoenix dactylifera* pertenecían al género *Aspergillus* sección *Nigri* y al género *Wallemia*.

ABSTRACT

The date palm (*Phoenix dactylifera*) is a representative crop of arid regions worldwide. In Mexico, the main producers are: Baja California, Baja California Sur and Sonora, where the Medjool and Deglet Noor varieties are grown.

Due to the export potential of date fruits, the areas dedicated to the monoculture of this species have increased, mainly in the Mexicali Valley, Baja California, this has led to an increase in the incidence of pests and diseases, which puts at risk production, export and to the final consumer. Additionally, due to the proximity to date-producing regions in Arizona and California, the spread of pests and diseases can be favored.

In the present study, date fruits were collected in four production areas in Mexicali, Baja California, and the main macroscopic (color, shape and type of colony) and microscopic (spore shape, conidium head and conidiophore) characteristics of each of the isolates. and molecular identification was performed. The microorganisms associated with the fruits of *Phoenix dactylifera* belonged to the genus *Aspergillus* section *Nigri* and the genus *Wallemia*.

1. INTRODUCCIÓN

La palma datilera pertenece a la familia *Araceae*, al género *Phoenix*, a la especie *P. dactylifera*, comúnmente conocida como palma datilera. El cultivo de *P. dactylifera* tiene su origen en países árabes desde el Golfo Pérsico hasta el Norte de África (Alotaibi *et al.*, 2023; Zaid y Ouhabi, 2022). El principal producto de la palma datilera es el fruto del dátil, el cual es comercializado a nivel mundial debido a su alto valor nutricional generando mil millones de dólares en ganancias a nivel mundial (Al-Alawi *et al.*, 2017; Ortiz-Uribe *et al.*, 2019).

La producción de dátiles a nivel mundial es de gran importancia agrícola en regiones con climas cálidos y áridos, generando ganancias globales de mil millones de dólares (Krueger *et al.*, 2021; FAOSTAT, 2022). En México *P. dactylifera* se produce en el Noroeste donde los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora son los principales productores (SIAP, 2023). En Baja California el área de siembra de *P. dactylifera* ha ido en aumento en los últimos años (SIAP, 2023), producto de un incremento en la demanda local y un alto potencial de exportación.

Una limitante en el cultivo de *P. dactylifera* han sido las pérdidas asociadas a plagas y enfermedades, estudios previos mencionan que la presencia de hongos durante el almacenamiento, empaque y comercialización (Rios y Rethwisch, 2019; Aniji *et al.*, 2015), las cuales pueden llegar hasta un 30% de la producción con la consecuente reducción de la calidad y el riesgo a la salud del consumidor final (Colman *et al.*, 2012; De la Rosa *et al.*, 2017; Goudarzi *et al.*, 2022; Palou *et al.*, 2013; Palou *et al.*, 2016). A pesar de que existen tratamientos químicos que reducen la incidencia de plagas y enfermedades, estos pueden ser una barrera a para la exportación debido a que existen regulaciones sobre el tipo concentración de productos que pueden ser utilizados (Sarrafi *et al.*, 2021), por lo que el uso de aditivos microbiológicos en campo y almacenaje ha sido estudiada en diferentes especies vegetales

observándose efectos en crecimiento y resistencia ante fitopatógenos (Samaniego-Gómez *et al.*, 2021; Sarraf *et al.*, 2021). Sin embargo, para poder implementar un programa eficiente del manejo de enfermedades es necesario conocer a los diferentes agentes causales de la enfermedad, por lo anterior en el presente estudio tiene por objetivo la caracterización molecular de diferentes tipos de microorganismos aislados de frutos de dátil (*Phoenix dactylifera*).

2. ANTECEDENTES

2.1 Botánica del cultivo de *Phoenix dactylifera* L.

La palma datilera (Fig. 1) es una planta diploide ($2n = 36$), dioica, perenne y monocotiledónea perteneciente a familia *Palmaceae* (Krueger *et al.*, 2021; Sancho y Andres, 2021; Othmani *et al.*, 2017). Las inflorescencias de árboles femeninos y masculinos difieren en morfología, pero ambos están encerrados en una cubierta dura y fibrosa (espata) que protege a las flores del calor y la luz durante la etapa inicial de desarrollo de la flor (Krueger, 2021; Sancho y Andres, 2021; Al-Alawi *et al.*, 2017).

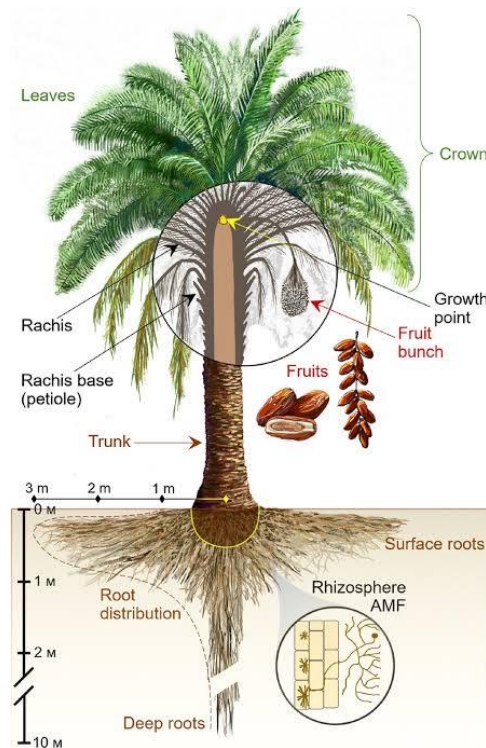


Figura 1. Descripción botánica de palma datilera (Alotaibi *et al.*, 2023).

Los dátiles florecen cuando la temperatura de la sombra aumenta a más de 18 °C y fructifican cuando la temperatura supera los 25 °C (Krueger, 2021). El fruto normalmente se desarrolla después de la fertilización de uno de los tres carpelos dentro de cada flor pistilada. La caída natural de la fruta ocurre de 25 a 35 días después del agrietamiento de la espata, y algunos cultivares tienen

una segunda caída de la fruta alrededor de 100 días después del agrietamiento de la espata, denominada “Caída de Junio” (Krueger, 2021; Salomón-Torres *et al.*, 2021).

2.2 Desarrollo del fruto de palma datilera

La fruta del dátil pasa por cuatro etapas distintas de maduración (Fig. 2), las cuales se denominan en términos derivados del árabe como “Kimri”, “Khalal”, “Rutab” y “Tamar” (Krueger *et al.*, 2021; Sancho y Andrés, 2021; Salomón-Torres *et al.*, 2021).

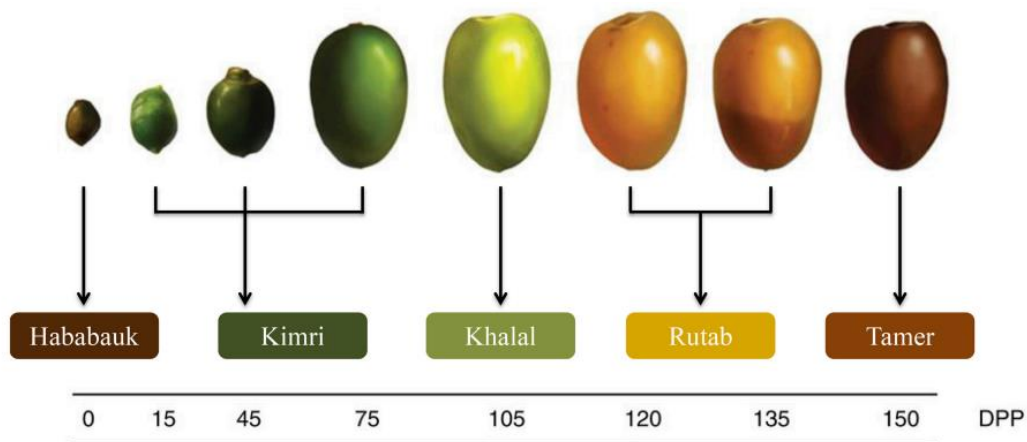


Figura 2. Etapas de desarrollo del fruto de dátil (Al-Alawi *et al.*, 2017).

Durante la etapa Kimri, la fruta aumenta de tamaño y peso rápidamente hasta la etapa Khalal. El color de la fruta cambia de verde durante Kimri al color amarillo característico de la etapa Khalal (Krueger *et al.*, 2021; Sancho y Andrés, 2021).

En la etapa Khalal el fruto permanece turgente, astringente debido a la cantidad sustancial de taninos hidrosolubles. En esta etapa la ganancia de peso y el tamaño del fruto disminuye drásticamente alcanzando un tamaño completo (Al-Alawi *et al.*, 2017; Salomón-Torres *et al.*, 2021).

La etapa Rutab se caracteriza por un oscurecimiento de la piel a marrón, acompañado de ablandamiento, disminución de la astringencia y aumento de

los taninos no hidrosolubles. Posteriormente, en la etapa Tamar, disminuye la humedad (siendo menor al 40%) y aumenta la proporción de azúcar (llegando a ser mayor al 30%) (Krueger *et al.*, 2021; Sancho y Andrés, 2021; Salomón-Torres *et al.*, 2021).

2.3 Cultivo de palma datilera

La palma datilera promedio produce 40 kg de fruta al año, con rendimientos mayores a 100 kg en condiciones de manejo intensivo. Las palmas hembras producen frutos a partir del cuatro año y su producción plena ocurre a los 15-20 años (Krueger, 2021; Ortiz-Uribe *et al.*, 2019; Wakil *et al.*, 2015).

2.4 Polinización

La polinización de *P. dactylifera* es llevada a cabo por el viento y dependiendo del cultivar dependerá el porcentaje de fructificación. De forma comercial se utiliza el polen de unas pocas palmas machos y se realiza la polinización artificial. Cuando se logran eficiencias del 60-80% de polinización de flores femeninas da como resultado un correcto cuajado, produciéndose un solo fruto por ovulo fecundado (Krueger, 2021; Salomón-Torres *et al.*, 2017).

2.5 Manejo del racimo

Posterior a la polinización los racimos se deben atar, ralear y embolsar (Krueger, 2021; Ortiz-Uribe *et al.*, 2019; Wakil *et al.*, 2015).

1. Atado de racimo: se realiza para que los tallos soporten el peso del fruto.
2. Raleo de racimos: se utiliza para reducir la producción alterna, aumentar el tamaño del fruto, adelantar la maduración y facilitar el manejo de racimos. El raleo se puede realizar mediante la eliminación de racimos enteros, reducción del número de hebras por racimo y reducción del número de frutos por hebra.
3. Embolsado de racimos: los racimos de dátiles se cubren con papel marrón, bolsas de malla o de nylon. El embolsado puede proteger los

racimos de frutas de la humedad, lluvia, minimizar el daño por quemaduras solares y disminuir las pérdidas causadas por las aves.

2.6 Riego

La palma datilera es capaz de soportar largos períodos de sequía a altas temperaturas, pero se requieren grandes cantidades de agua para un crecimiento vigoroso y un rendimiento alto con frutos de alta calidad. Estudios realizados en California y en otros países mostraron que el consumo anual de agua por *P. dactylifera* puede variar yendo de 15,000-55,000 m³/Ha, lo cual dependerá del sistema de riego (Bazrafshan *et al.*, 2020; Minikaev *et al.*, 2021; Al-Naim *et al.*, 2022; Alotiabi *et al.*, 2023).

La aplicación de un exceso de agua no incrementa la tasa de crecimiento y el rendimiento de frutos en palmas datileras, mientras que la retención de agua en meses impactó en las características de los frutos, al generarse frutos con menor humedad (Mattar *et al.*, 2021, Al-Naim *et al.*, 2022).

2.7 Propagación

Existen tres métodos para la propagación de la palma datilera: propagación por hijuelos, propagación por plántulas y propagación *in vitro*.

Método 1: Propagación por hijuelos

El método más común es la propagación vegetativa de retoños, que asegura la identidad genética de las variedades maternas. Los brotes se desarrollan a partir de yemas axilares en el tronco cerca de la superficie del suelo durante la etapa juvenil de la palmera datilera. Los retoños, después de 3 a 5 años de adherirse a la palma parental, producen raíces y pueden ser removidos y plantados. Esta es aproximadamente la edad en que los retoños comenzarán a producir flores y, en líneas femeninas, frutos (Krueger, 2021; Ortiz-Uribe *et al.*, 2019).

Método 2: Propagación por plántulas

El segundo método de propagación es usar plántulas al azar de cruces sexuales (Fig. 4). Las plántulas no son idénticas a los árboles maternos y no son uniformes genéticamente, variando mucho en su producción y calidad de frutos (Alotibi *et al.*, 2023; Cao *et al.*, 2007; Kharzhevskaya, 2021). Alrededor del 50% de las plántulas son machos, aunque no se pueden identificar hasta que los árboles comienzan a florecer después de 4 a 5 años. La producción y la calidad de la fruta de las arboledas derivadas de plántulas se reducen considerablemente en comparación con las arboledas desarrolladas a partir de retoños.

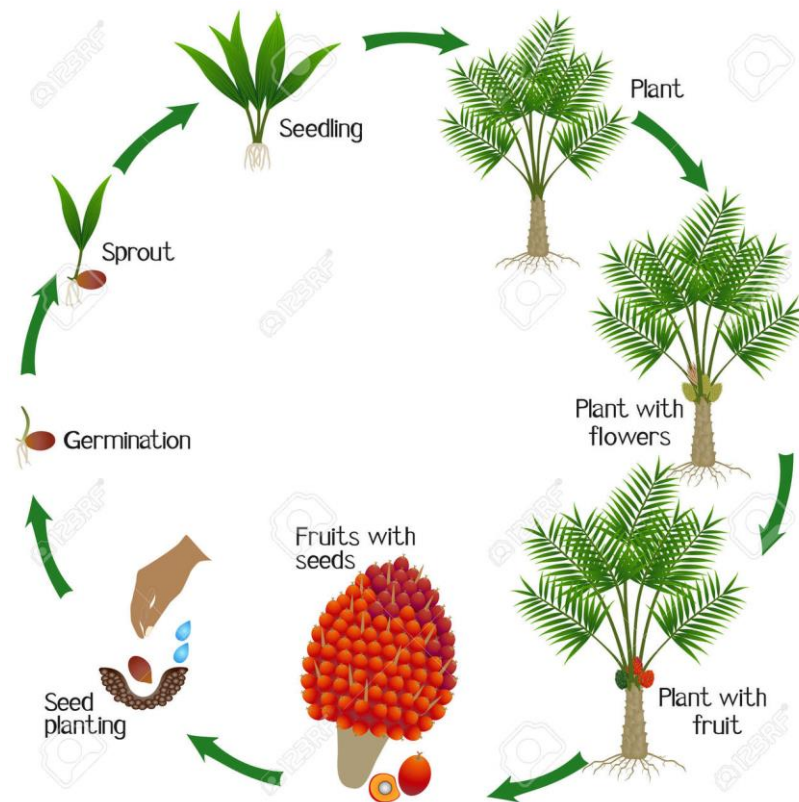


Figura 3. Propagación de *P. dactylifera* mediante plántula (Kharzhevskaya, 2021).

Método 3: Propagación *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales (CTV), son una serie de técnicas que permiten la propagación de material vegetal de forma estable, mediante el uso de medio de cultivo artificiales en condiciones asépticas y controladas (George *et al.*, 2007). Este tipo de aplicación biotecnológica es ampliamente utilizada debido a que se producen plantas libres de patógenos (Almusawi *et al.*, 2017; George *et al.*, 2007) con características similares a las propagadas por hijuelos. Durante el CTV se hace uso de diferentes tipos de tejidos (explantes) en presencia de fitohormonas, donde la sinergia entre estas puede iniciar diferentes tipos de respuesta como es la proliferación de yemas, derivada de tejido meristemático o mediante procesos de organogénesis (Fig. 4).



Figura 4. Micropropagación *in vitro* de *P. dactylifera*. (a) Espata floral. (b) Diferentes tipos de explantes. (c) Formación de yemas adventicias. (d) Multiplicación de yemas. (e) Alargamiento. (f) Enraizamiento. (g) Aclimatación de las plántulas. (h) Plántulas en condiciones de invernadero (Almusawi *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que existe una gran dependencia del genotipo difiriendo la respuesta entre cultivares y dependiendo del tipo de protocolo de CTV existe el riesgo de generar variantes somaclonales (Mirani *et al.*, 2020).

2.8 Patógenos en dátíl

La producción de dátiles a nivel mundial es de gran importancia agrícola en regiones con climas cálidos y áridos, generando ganancias globales de mil millones de dólares (FAOSTAT, 2022). En México representa una derrama económica de 715 millones de pesos (SIAP, 2020), donde los principales estados productores son: Baja California, Sonora, Baja California Sur y Coahuila, con una producción al alza de 8,000 Ton en 2016, alcanzando 12,300 Ton en 2019. Datos de 2021, muestran que México es el quinto productor a nivel mundial de frutos de dátíl de la variedad Medjool al superar las 19,800 Ton de este cultivo (Olano, 2021).

La producción de este tipo de cultivos se ve mermada por la presencia de diferentes organismos y microorganismos patógenos que reducen la productividad y la calidad de los frutos durante las labores de almacenamiento y transporte. Así mismo, debido a que el principal destino de la producción de dátíl es la exportación, existen una serie de productos permitidos para el control de patógenos (Samaniego-Gómez *et al.*, 2021; Sarrad *et al.*, 2021; Zadehdabagh *et al.*, 2010).

La mayoría de las enfermedades reportadas en el cultivo del dátíl están asociadas principalmente con patógenos fúngicos como son la enfermedad de Bayoud causada por *Fusarium oxysporum subsp. albedensis*, la cual afecta el sistema radical de la planta causando su marchitez siendo las variedades Deglet Noor y Medjool altamente susceptibles a este patógeno (Aniji *et al.*, 2025). Así mismo otros miembros del género *Fusarium* como *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, las cuales son responsables de marchitamientos en plantas y en el caso de *F. solani* puede afectar semillas (Abdullah *et al.*, 2010; Colman *et al.*, 2012). Otro patógeno de importancia es

Mauginiella scaettae, el agente causal de la pudrición floral, este patógeno usualmente está asociado con otros hongos fitopatógenos como son: *Trichothecium roseum*, *Botrytis aclada*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Acremonium strcitum* y *Memmoniella sp* (Abdullah *et al.*, 2010).

Es importante mencionar que durante la fase de almacenamiento de *P. dactylifera*, así como en otras especies, se han observado diferencias en los microorganismos presentes al compararse con los de almacenaje, donde miembros de géneros como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Wallemia* han sido reportados previamente (Espinoza *et al.*, 2023; Goudarzi *et al.*, 2022; Medina *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2015; Palou *et al.*, 2013, 2016; Quaglia *et al.*, 2020). La presencia de hongos en fases de almacenamiento es de importancia debido a que diferentes tipos de hongos son capaces de producir aflatoxinas, las cuales presentan un riesgo a la salud del consumidor (Medina *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2015).

2.9 Métodos de Identificación

2.9.1 Microbiología clásica

Los estudios basados en aislamiento de microorganismos permiten obtener una lista de especies, esto permite a los investigadores comparar datos entre sitios, estudios y entre diferentes grupos taxonómicos o ecológicos. En lo referente a hongos, estos pueden compararse mediante la interpretación de los factores biológicos y ambientales que influyen en la estructura de la comunidad a gran escala mediante el uso de herramientas como es el metaanálisis (Yuan *et al.*, 2020; Varga *et al.*, 2011).

Los métodos clásicos son los únicos que se pueden utilizar para demostrar qué los microorganismos son viables. Estos métodos se utilizan para inventariar hongos afines a un área, sustrato definido o una condición ambiental determinada, además de ser menos costosos que los métodos moleculares (Yuan *et al.*, 2020).

La principal desventaja de este tipo de métodos como que algunos microorganismos no pueden cultivarse, por lo que existirá un sesgo en la composición de una comunidad microbiana. En comparación con las técnicas moleculares, los métodos de muestreo clásicos pueden llevar mucho más tiempo (Perini *et al.*, 2019; Straatsma *et al.*, 2001). Además, se requiere más experiencia taxonómica para los métodos clásicos que para los métodos moleculares, ya que todas las especies deben identificarse en función de los caracteres morfológicos lo cual alarga el tiempo de estudio.

2.9.2 Marcadores enzimáticos

Este tipo de análisis se basa en la reacción enzimática, de un antígeno o anticuerpo, para la detección de un compuesto u organismo de interés. La prueba más utilizada es el ensayo enzimático ligado a enzima (ELISA), las pruebas ELISA son diseñadas para que un antígeno o anticuerpo sea capaz de detectar y cuantificar a un determinado tipo de microorganismos (bacterias, virus) que en condiciones de cultivo serían difíciles de detectar (Ramírez *et al.*, 2022).

En esta prueba se utilizan antígenos que son proteínas extrañas para el organismo que son capaces de estimular la producción de anticuerpos, estos estarán dirigidos a proteínas las cuales son elegidas para ser el objetivo de detección de una prueba ELISA (Aydin, 2015; Ramírez *et al.*, 2022). Este tipo de interacción ha hecho posible elaborar diferentes tipos de ensayos como son (Fig. 5):

1. ELISA directo: en la superficie de una placa se recubre directamente con la muestra y se incuba con un anticuerpo conjugado a una enzima. La muestra se lava para eliminar el exceso de anticuerpo, para finalmente agregar el sustrato al medio generando una señal colorida directamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. La correlación se puede usar para extrapolar la concentración de antígeno.

2. ELISA sándwich: en la superficie de una placa se añade un anticuerpo de captura específico a un antígeno determinado. En una segunda fase de incubación se añade un anticuerpo secundario al complejo formado en el primer paso. El anticuerpo secundario puede estar directamente conjugado a una enzima que sólo requiera la adición del sustrato o estar unido a un marcador que requiera la adición de un segundo compuesto directamente con el sustrato. Cuando se agrega un sustrato cromogénico al ensayo para desarrollar color, las muestras con una alta concentración de antígeno generan más señal que aquellas con una baja concentración de antígeno, lo que produce una señal directamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.
3. ELISA competitivo: la presencia y la cantidad de un antígeno particular en una muestra se determina por su capacidad para competir con un antígeno de referencia marcado para unión a un anticuerpo fijo en una placa. Una cantidad determinada de anticuerpo no marcado se fija a un grupo de placas y una preparación de estándar de referencia de un antígeno marcado se une a ellas.

Unas de las limitantes son baja sensibilidad en los primeros días de enfermedad. Requiere pruebas rigurosas de reactividad cruzada con otra respuesta inmune y es necesario que se realice en el laboratorio con equipos especializados. (Hernández-Pérez *et al.*, 2020).

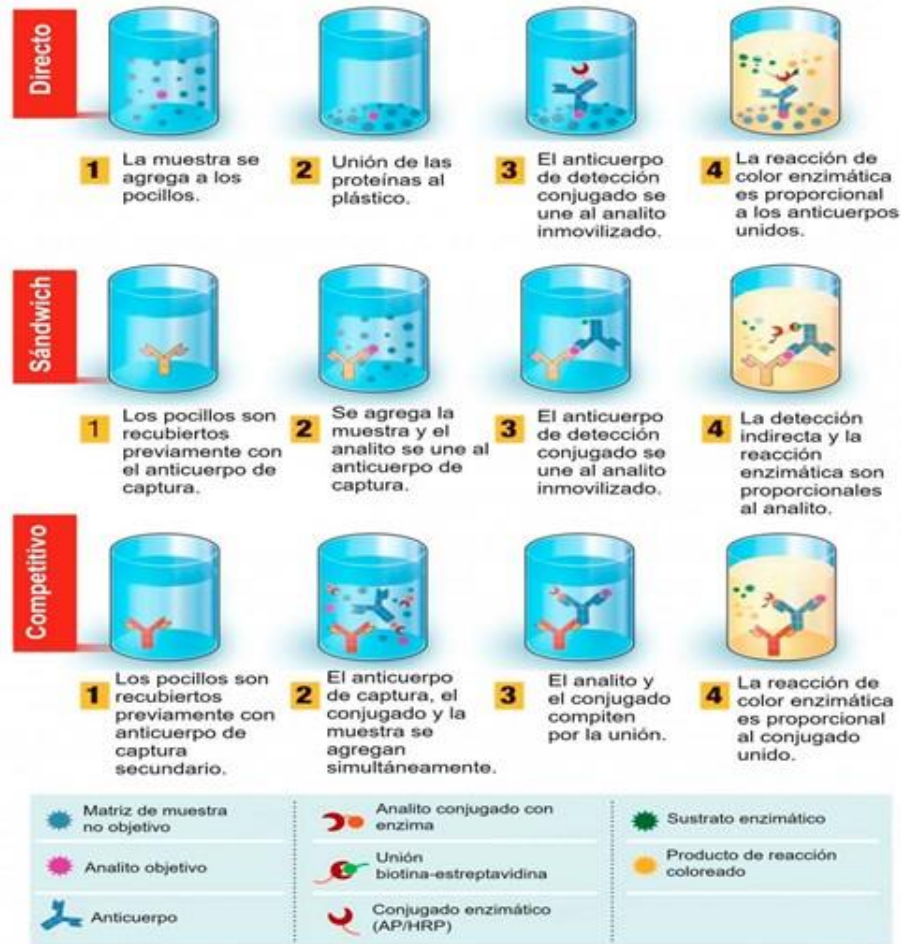


Figura 5. Esquema de los diferentes ensayos de tipo ELISA (Ramírez *et al.*, 2022).

2.9.3 Marcadores moleculares

Son aquellos fragmentos de ADN, ARN o proteínas cuyo tamaño (peso molecular) es conocido y que sirve para monitorear cambios en un fenotipo (Azofeifa-Delgado *et al.*, 2006; Rallo *et al.*, 2002). Este tipo de marcadores supera las limitaciones de los métodos tradicionales, ya presentan una mayor diversidad, son aplicables a diferentes tipos de tejido y pueden ser evaluados desde fases iniciales de desarrollo.

Los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten la amplificación exponencial de fragmentos, los cuales son específicos y son los más utilizados (Azofeifa-Delgado, 2006; Medina *et al.*, 2005). La amplificación de fragmentos de PCR y su secuenciación han permitido la caracterización de cepas hasta nivel de especie mediante el uso de regiones conservadas como es la región del ARN ribosomal 16S (bacterias), Ciclooxygenasa mitocondrial (COX) en insectos y el espaciador inter-transcritos (ITS) para hongos (Goudarzi *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2015; Perini *et al.*, 2019; Quaglia *et al.*, 2020).

Técnicas moleculares más recientes se basan en la amplificación masiva de las secuencias presentes las regiones antes mencionadas, en sistemas libres de células pudiéndose obtener el perfil taxonómico de comunidades, identificar géneros microbianos benéficos y patogénicos, así como el potencial metabólico a nivel de una comunidad o tejido (Nikolchina y Rodrigues, 2021; Piombo *et al.*, 2020; Valle-Gough *et al.*, 2019, 2022). Este tipo de estudios libre de cultivo han permitido identificar una amplia variedad de géneros microbianos que habitan diferentes tejidos (fruto, hojas, raíz) pudiendo dar seguimiento a los microorganismos con potencial patogénico, aquellos con potencial para el control biológico y con potencial agroindustrial (Adbelfarrahet *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013; Quaglia *et al.*, 2020; Samsom *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2011). Estudios realizados en *P. dactylifera* por Piombo *et al.*, (2020) observaron cambios en el microbioma fúngico en diferentes capas del fruto,

donde se observaron géneros potencialmente patógenos (*Alternaria* y *Aspergillus*) así como levaduras que son utilizadas en el control biológico (*Metschnikowia*).

3 JUSTIFICACIÓN

La palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.) ha sido durante mucho tiempo uno de los cultivos frutales más importantes en las regiones áridas en Oriente medio y África del Norte. Durante los últimos años, los dátiles también se han introducido en nuevas regiones de cultivo como: Australia, India, Pakistán, México, Sudáfrica, Sudamérica y Estados Unidos.

Este cultivo en México ha tenido éxito por su adaptación a las condiciones agroclimáticas del noroeste, en especial en el Valle de Mexicali, Baja California y en San Luis Rio Colorado, Sonora. Estos se caracterizan por veranos largos y calurosos, sin lluvias (o muy escasas) y un nivel de humedad relativa muy bajo durante el período de maduración lo cual favorece el desarrollo del fruto de dátil. Este fruto es la principal fuente de ingresos y un alimento básico para los residentes de países productores desempeñando un papel importante en las economías, sociedades y entornos de estos países. Sin embargo, la presencia de microorganismos patógenos presentes es un riesgo para el consumo y exportación de este cultivo.

Reportes previos señalan que los frutos de *P. dactylifera* y la planta es susceptible al ataque de hongos fitopatógeno y en algunos casos la presencia de estos microorganismos conlleva riesgos a la salud humana, por lo que el estudio y caracterización de estos agentes fitopatógenos es de importancia para poder llevar a cabo un manejo eficiente de las enfermedades del cultivo y por ende disminuir las mermas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar molecularmente los diferentes aislados presentes en frutos de dátil (*Phoenix dactylifera* L.) variedad Medjool en el valle de Mexicali, Baja California.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1. Realizar el cultivo de los microorganismos presentes en estadios de maduración Tamar en frutos de *P. dactylifera* en diferentes medios de crecimiento.

4.2.2. Identificar molecularmente cada aislado de microorganismos mediante la amplificación de la región ITS y su comparación en diferentes bases de datos.

4.2.3. Realizar la reconstrucción filogenética molecular de los aislados microbianos presentes en *P. dactylifera*.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia que siguió para cumplir los objetivos del presente proyecto se muestra en la Figura 6.

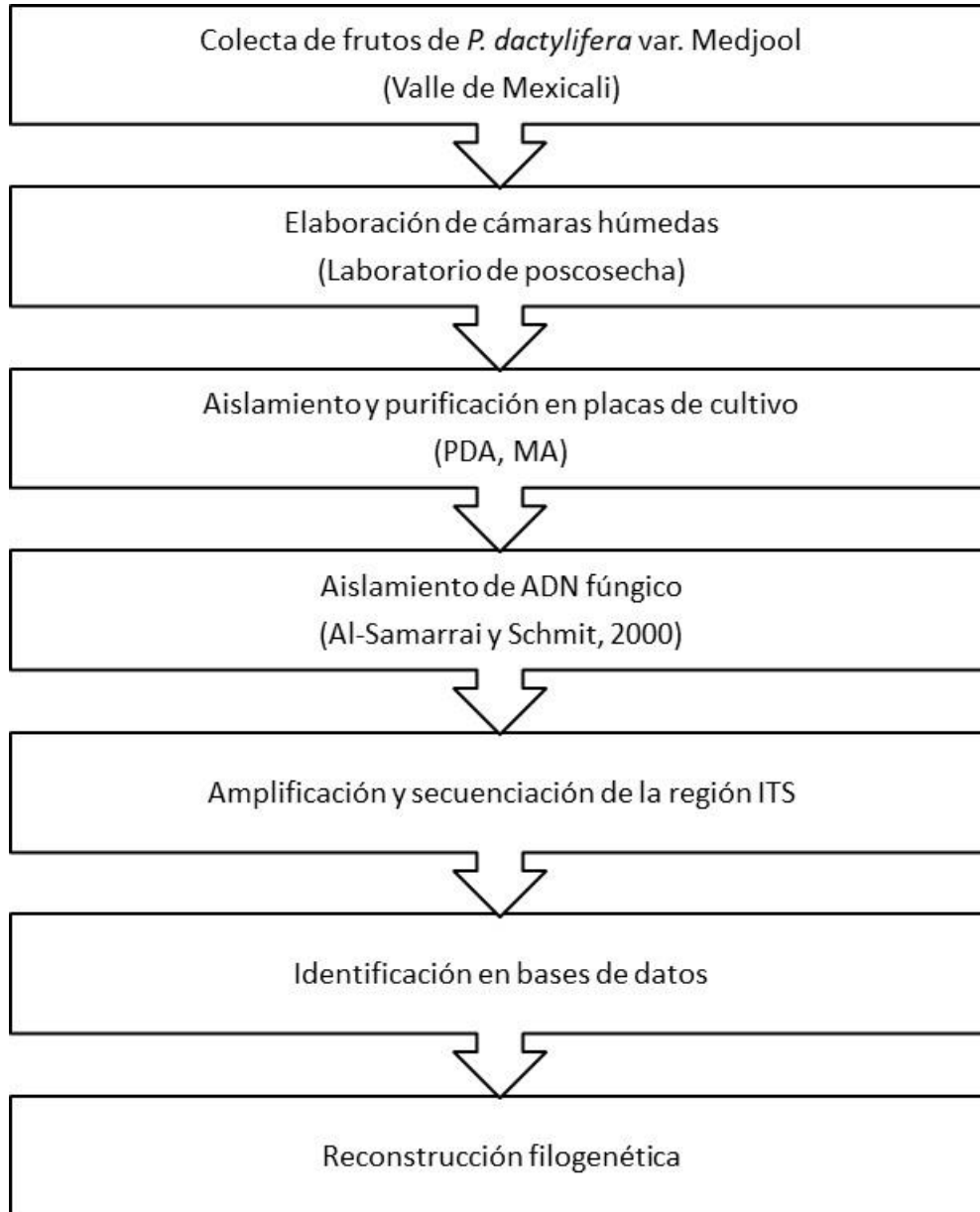


Figura 6. Diagrama experimental para la identificación molecular de hongos aislados en frutos de *P. dactylifera*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colección de muestra de dátiles en el Valle de Mexicali

Se recolectaron frutos de dátiles de cuatro plantaciones diferentes de *P. dactylifera* var. Medjool (32°33'45.14"N, 115°12'34.29"W; 32°36'35.75"N, 115°14'25.31"W; 32°32'35.71 "N, 115°31'20.18"W; 32°27'40.35"N, 115°11'27.02"W) en Mexicali, Baja California, México, durante agosto-noviembre de 2022. Las muestras fueron georreferenciadas por GPS con el Aplicación GPS-Waypoints y sobrevoladas con un Drone Phantom 3.

Se recolectaron al azar un total de 320 frutos en etapa Tamar de palmas datileras de cada plantación, las cuales se colocaron en bolsas de papel debidamente etiquetadas (Goudarzi *et al* 2022; Colman *et al.*, 2012), finalmente las muestras se introdujeron en una hielera con paquetes refrigerantes para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Fisiología y Manejo Poscosecha.

6.2 Aislamiento fúngico, identificación morfológica y molecular

Las frutas con síntomas de la enfermedad se incubaron en cámaras húmedas, luego con una aguja de disección estéril, los crecimientos fúngicos se transfirieron a cajas de Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA). Los cultivos se colocaron en incubadora (VWR, 51014995), 28 ± 2 °C y 72 h, con observaciones diarias hasta observar la presencia de colonias conforme a lo establecido por Cervantes-Díaz y Samaniego-Gámez, (2012). Los discos se sembraron en placas Petri con medio PDA. Una vez aislados, la identificación del microorganismo se realizó mediante claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1998).

Los hongos de cultivos en placa de PDA se seccionaron con bisturí estéril y se colocaron en caldo Extracto de Levadura-Peptona-Glucosa (YPG), 10 d (25 °C y 37 °C), se filtró el medio de cultivo y se almacenaron los tubos (-20 °C) hasta su uso posterior. El ADN se extrajo con el protocolo de Al-Sammarrai y Schmidt (2000), la integridad del ADN se evaluó en geles de agarosa (1% p/v).

La amplificación de la región ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se describe en el Cuadro 1. Los tubos se colocaron en termociclador (BioRad) con las siguientes condiciones: 95 °C (10 min), 30 ciclos de 95 °C (1 min), 55 °C (1 min) y 72 °C (1.5 min) con una extensión final de 72 °C (10 min), y una longitud de amplicón de 420-825 pb.

Cuadro 1. Componentes de reacción de PCR para la amplificación de la región ITS.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Amortiguador de PCR 10X	2 µL	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL	1.5 mM MgCl ₂
dNTPS (10 mM)	0.5 µL	250 µM dNTPs
Cebador ITS1 (10 µM)	1µL	250 nM
Cebador ITS4 (10 µM)	1 µL	250 nM
Taq-Polimerasa (100 U/µL)	0.4 µL	1.5 Unidades
Muestra de ADN	2 µL	
Agua grado biología molecular	11 µL	
Volumen final	20 µL	

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa (1% p/v), los fragmentos se purificaron con el gel Wizard SV PCR Clean-Up System (Promega) con el protocolo sugerido por el fabricante. Los fragmentos purificados se secuenciaron en MacroGen (Corea).

6.3 Pruebas de patogenicidad

Los aislamientos purificados se observaron macroscópica y microscópicamente y se verificaron los postulados de Koch. Los aislamientos

con síntomas iniciales en el pericarpio, mesocarpio, endocarpio y semilla de dátil fueron re-inoculados en dátiles asintomáticos, mediante suspensión de esporas y con herida de aguja de disección estéril. Se revisó el desarrollo de síntomas a los 3, 6, 9 y 12 días después de la inoculación, en las fechas que presentaron el síntoma inicial se realizaron re-aislamientos para ser observados macroscópica y microscópicamente (Cohen *et al.*, 2021).

6.4 Secuenciación de ADN y análisis filogenéticos

Las secuencias obtenidas se compararon en el GenBank con el algoritmo BLASTn en la Región Espaciadora Transcrita Interna (ITS) de tipo Fungi y material de referencia con la opción de búsqueda Megablast. En el caso de los organismos plaga se utilizó la base no redundante mediante Megablast.

Los resultados de la búsqueda BLAST recuperados se introdujeron en el software MEGA (v10.0) para el análisis filogenético. Las secuencias fúngicas se alinearon con el algoritmo ClustalW con la Matriz Clustal, la reconstrucción filogenética se realizó utilizando Maxima Parsimonia (MP) con los siguientes parámetros: BootStrap (BS) = 1000 réplicas, Número de árboles de Parsimonia = 10 y Tree Bisection Reconnection.

7. RESULTADOS

Los resultados del estudio mostraron que la enfermedad aislada tenía un origen fúngico, observándose crecimientos negros en el interior de los frutos de dátil (Fig. 7 B). Las pruebas de patogenicidad mostraron que en frutos asintomáticos no se observó el crecimiento de patógenos de tipo fúngico en cámaras húmedas (Fig. 7 C), sin embargo, inoculaciones artificiales de crecimientos en cámaras mostró la proliferación de colonias de color negro en medio PDA (Fig. 7 D). Observaciones al microscopio revelaron la presencia de conidióforos marrones (Figura 7 E), vesículas globosas de 80 μm de diámetro y conidios de 5 μm (Figura 7 F). Los hongos fueron identificados como *Aspergillus* sp, de acuerdo a las claves taxonómicas.

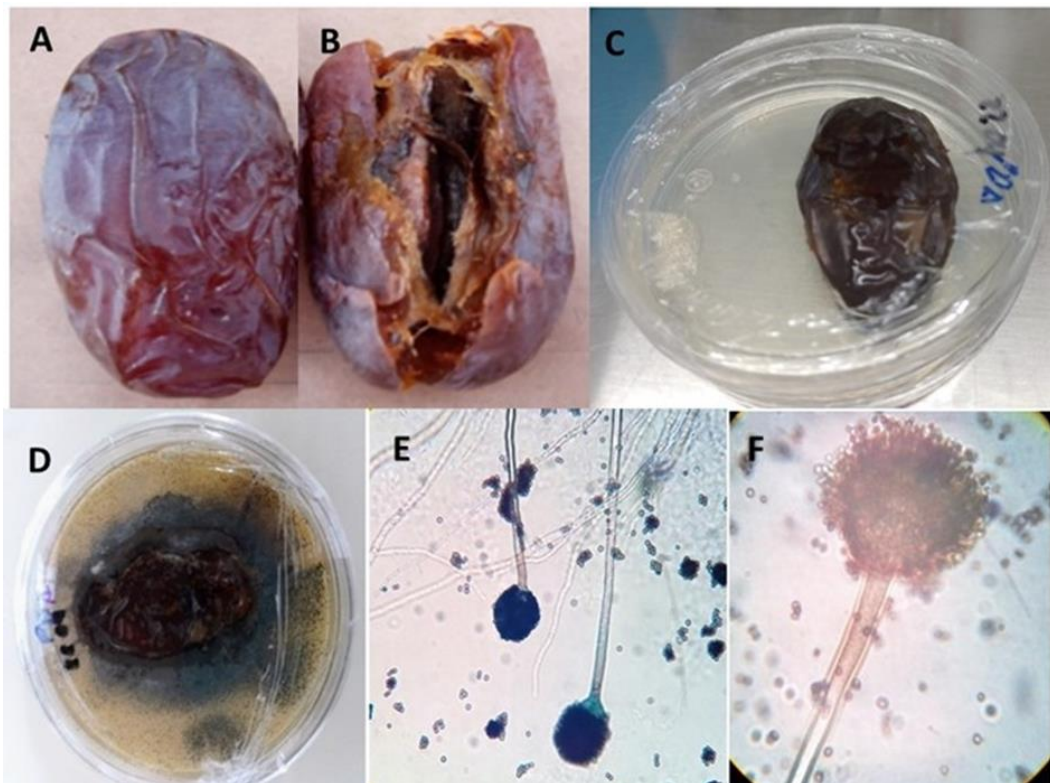


Figura 7. Síntomas de la enfermedad del moho negro causado por *Aspergillus* en frutos de palmera datilera (*Phoenix dactylifera*) del Valle de Mexicali. (a) Fruto sano en estado de Tamar; (b) Síntomas de la enfermedad del moho negro en los dátiles; (c) fruto asintomático en prueba de patogenicidad; (d) Síntomas de moho negro en dátiles usando inoculaciones artificiales con aislamientos de *Aspergillus* sp obtenidos de cultivo; (e) Hifas y conidióforos de placas PDA (40x); F) Cabeza conidial globosa marrón-negra y conidios (100x).

A nivel de especie varios aislamientos mostraron un alto porcentaje de identidad (99.5-99.9 %) con *A. tubingensis* (NR_131293.1), otros aislamientos mostraron un alto porcentaje de identidad (99.1-99.8 %) con *A. costaricensis* (NR_103604.1) y un aislado mostró un alto porcentaje de identidad con *Wallemia sebi* (NR_131988.1) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de la búsqueda en el NCBI de las secuencias ITS de aislados fúngicos en frutos de *P. dactylifera*

Aislados	Resultados de la búsqueda	Identidad (%)	Expectancia	Número de acceso
MH1-C1	<i>Aspergillus tubingensis</i>	98.57	0.0	NR_131293.1
MH1-C2	NRRL 4875 ITS region; from TYPE material	99.64	0.0	
MH1-C3		99.11	0.0	
MH1-C4		99.64	0.0	
MH2-C2		99.65	0.0	
MH2-C3		99.82	0.0	
MH3-C1		99.29	0.0	
MH4-C2		99.44	0.0	
MHB-C4		91.49	0.0	
MH2-C1	<i>Aspergillus costaricensis</i>	99.12	0.0	NR_103604.1
MH2-C4	CBS 115574 ITS region; from TYPE material	99.82	0.0	
MH3-C2		99.47	0.0	
MH3-C3		99.63	0.0	
MH3-C4		99.64	0.0	
MH4-C1		99.63	0.0	
MH4-C3		99.47	0.0	
MH4-C4		99.45	0.0	
MHB-C3		99.82	0.0	
MHB-C1	<i>Wallemia sebi</i>	93.59	0.0	NR_131988.1

CBS 818.96 ITS
region; from
TYPE material

El análisis filogenético realizado por MP mostró la formación de ocho clados (Fig. 8 A), que incluyen a los grupos externos (*A. flavus* y *A. aflatoxiformans*), los cuales se distribuyeron en varios clados de la sección *Nigri* de *Aspergillus*. En el grupo *Tubingensis* se observaron tres clados (*A. tubingensis*, *A. vadensis*, *A. costaricensis*), el grupo *Carbonarius* con un clado (*A. carbonarius*, *A. sclerotioniger*), el grupo *Niger* con dos clados (*A. niger*, *A. brasiliensis*, *A. piperis*, *A. awamori*, *A. weltwitschiae*, *A. foetidus*, *A. luchuensis*) y el grupo Heteromorphus con un clado (*A. heteromorphus*, *A. ellipticus*).

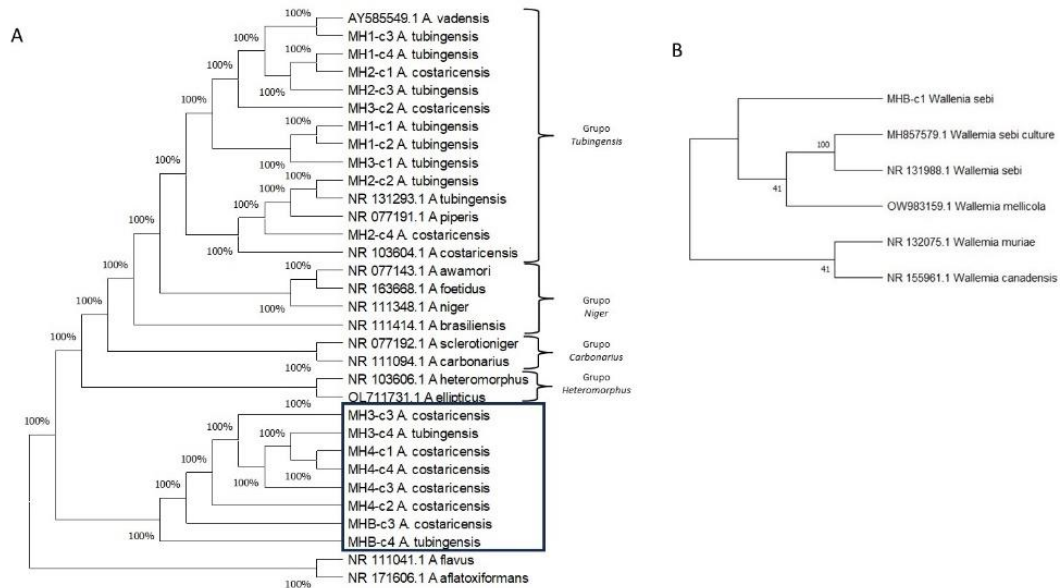


Figura 8. Análisis filogenético de aislados fúngicos en frutos de *P. dactylifera* var Medjool. A) Filogenia de secuencias ITS de aislados del género *Aspergillus* sección *Nigri*. B) Filogenia de secuencias ITS de aislados del género *Wallemia*.

En lo referente al género *Aspergillus*, el análisis molecular reveló que la sección *Nigri* fue la que se desarrolló en frutos de dátil, esta sección está compuesta por al menos 15 especies entre los que encontramos a *A. tubingensis*, *A. costaricensis*, *A. niger* y *A. brasiliensis*, por mencionar algunas.

8. DISCUSIÓN

Observaciones similares han sido reportadas en otros estudios, que mencionan a *Aspergillus niger* como plaga infectante poscosecha en dátiles (Aniji *et al.*, 2015; Colman *et al.*, 2012, Ríos y Rethwisch, 2019). La búsqueda BLAST mostró la presencia del género *Aspergillus* en la mayoría de los aislamientos (94,7 %) y la presencia del género *Wallemia* en un aislamiento.

La presencia de *Wallemia sebi* se puede deber a las condiciones baja humedad en el valle de Mexicali, esta especie se ha reportado que es xerotolerante y puede encontrarse en ambientes con altas concentraciones de salinidad, este género se ha podido aislar de productos como son conservas, jaleas o frutos secos, como es el caso del dátil (Zalar *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2015).

La sección *Nigri* fue la que se desarrolló en frutos de dátil, esta sección está compuesta por al menos 15 especies entre los que encontramos a *A. tubingensis*, *A. costaricensis*, *A. niger* y *A. brasiliensis*, por mencionar algunas (Samson *et al.*, 2004). Así mismo, esta sección ha sido difícil de caracterizar morfológicamente debido a diferencias sutiles entre cada miembro (Samson *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2005).

En el presente estudio se observó que los aislados secuenciados se agruparon en diferentes clados, principalmente en las sub-divisiones sugeridas por Samson *et al.*, (2004), donde en la sub-división *A. tubingensis* se encontraron a *A. tubingensis* y *A. costaricensis*, los cuales formaron la mayor parte de los aislados del presente estudio y se agruparon en diferentes subdivisiones, las cuales coinciden con las que han sido reportadas previamente (Samson *et al.*, 2004; Quaglia *et al.*, 2020).

Los hongos pertenecientes a *Aspergillus* sección *Nigri* están presentes a nivel mundial siendo unos de los principales hongos responsables de la degradación de alimentos (Samson *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2005; Aloram

et al., 2020; Nikolchina y Rodrigues, 2021). Así mismo, estos hongos han sido utilizados en procesos industriales de sacarificación como *A. costaricensis* (Lei *et al.*, 2022), es de mencionar que esta sección está considerada como hongos GRAS (Generally Reagarded as Safe) por varias normativas, existen reportes donde hay algunos miembros de esta sección que son capaces de producir aflatoxinas (Ochratoxina A), sin embargo, la producción de este tipo de compuestos puede estar influenciado por la calidad del fruto y la presencia de aditivos que puedan retrasar el desarrollo del hongo (Samson *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2005; Nikolchina y Rodrigues, 2021).

9. CONCLUSIONES

Los patógenos asociados a la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) en producción y poscosecha fueron *Aspergillus costaricensis*, *Aspergillus tubingensis* y *Wallemia sebi*. Con los resultados de la identificación de estas plagas, es posible la elaboración de un programa de manejo integrado de enfermedades asociadas a la palmera datilera en el noroeste de México. Estudios posteriores deberán estar dirigidos a establecer los aislados con el potencial de generación de aflatoxinas mediante estudios moleculares y metabólicos de los aislados.

10. REFERENCIAS

1. Abdelfattah, A., Wisniewski, M., Droby, S. y Schena, L. (2016). Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture Research*, 3, 16047. doi:10.1038/hortres.2016.47.
2. Almusawi, A.H., Sayegh, A.J., Alshanaw, A.M., y Griffis, J.L. (2017). Plantform bioreactor for mass micropropagation of date palm. En: J.M. Al-Khayri, S.M Jain y D.V. Johnson. *Date Palm Biotechnology Protocols Volume I: Tissue Culture Applications*. 251-265. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7156-5_21
3. Aloram, M., Houbraken, J. y Newcombe, G. (2020). *Aspergillus tubingensis* Is a Pre-Emergent Pathogen of Date Palm Seedlings. *Forests*, 11, 1327; doi:10.3390/f111121327
4. Alnaim, M.A., Mohamed, M.S., Mohammed, M. y Munir, M. (2022). Effects of automated irrigation systems and water regimes on soil properties, water productivity, yield and fruit quality of date palm. *Agriculture*, 12 (3), 343.
5. Anjili, S. M., Channya, F. K., & Chimbekujwo, I. B. (2015). Fungi associated with post-harvest spoilage of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in Yola, Adamawa State. *International Journal of Research*, 14.
6. Al-Samarrai, T.H. y Schmid, J. (2000). A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in applied microbiology*, 30 (1), 53-56.
7. Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
8. Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 221-242.

9. Al-Alawi, R.A., Al-Mashiqri, J.H., Al-Nadabi, J.S., Al-Shihi, B.I. y Baqi, Y. (2017). Date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.): natural products and therapeutic options. *Frontiers in Plant Science*, 8, 845.
10. Alotaibi, K.D., Alharbi, H.A., Yaish, M.W., Ahmed, I., Alharbi, S.A., Alotaibi, F. y Kuzyakov, Y. (2023). Date palm cultivation: A review of soil and environmental conditions and future challenges. *Land Degradation and Development*, 34 (9), 2431-244
11. Barnett, H.L. y Hunter, B.B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. Illustrated genera of imperfect fungi (3 ed). *The American Phytopathological Society*.
12. Bazrafshan, O., Zamani, H., Etedali, H. R., Moshizi, Z. G., Shamili, M., Ismaelpour, Y. y Gholami, H. (2020). Improving water management in date palms using economic value of water footprint and virtual water trade concepts in Iran. *Agricultural Water Management*, 229, 105941.
13. Cervantes-Díaz L. y Samaniego-Gómez B.Y. (2012). Manual de Prácticas de Laboratorio de Fitopatología. *Universidad Autónoma de Baja California*. ISBN 978-607-607-108-3.
14. Cohen, B.D., Ilan, E., y Yarden, O. (2021). The Culturable Mycobiome of Mesophotic *Agelas oroides*: Constituents and Changes Following Sponge Transplantation to Shallow Water. *Journal of Fungi*, 7(7), 567.
15. Colman, S., Spencer, T.H.I., Ghamba, P.E., y Colman, E. (2012). Isolation and identification of fungal species from dried date palm (*Phoenix dactylifera*). 2063-12066.
16. De la Rosa-Alcaraz, M.A., Torrescano-Urrutia, G.R., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J. y Sánchez-Escalante, A. (2017). Evaluación de fitoquímicos y actividad antioxidante de subproductos de dátil (*Phoenix dactylifera* L.) producidos en el estado de Sonora. *Biotecnia*, 19, 11–17. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v19i3.442>
17. Espinoza, J.E.C., Gough, R.E.V., Ramírez, F.N., Gómez, S.U.S., Gavira, J.M.B., Sauret, L.T. y Gómez, B. Y. S. (2023). Aislamiento e

identificación de hongos fitopatógenos en dátiles en poscosecha en Valle de Mexicali, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 27(Especial), 22.

18. George, E.F., Hall, M.A. y De Klerk, G.J. (Eds.). (2007). Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background (Vol. 1). *Springer Science & Business Media*.
19. Goudarzi, A., Bagheri, A. y Hajebi, A. (2022). *Aspergillus niger* causes black mould disease on Piarom dates, the most economically valuable export date cultivar in southern Iran. *Crop Protection*, 160, 106047.
20. Hernández-Pérez J.M., Martín-González E. y Pino-Yanes, M. (2020). Strengths and weakness of diagnostic tests of SARS CoV-2 infection. *Med Clin (Barc)*, 27, 155 (10). 464-465. doi: 10.1016/j.medcli.2020.05.019.
21. Kharzhevskaya, N.H. (2021). Ciclo de crecimiento de palmera datilera sobre Fondo Blanco. Ilustración del crecimiento. Consultado: octubre de 2023 en <https://es.dreamstime.com/ciclo-de-crecimiento-palmera-datilera-sobre-fondo-blanco-hermosa-ilustraci%C3%B3n-image211509583>
22. Krueger, R.R. (2021). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) biology and utilization. In *The Date Palm Genome, Vol. 1: Phylogeny, Biodiversity and Mapping*. Cham: Springer International Publishing, 3-28.
23. Lei, Z., Chen, X., Cao, F., Guo, Q y Wang, J. (2022). Efficient saccharification of *Lycium barbarum* leaf biomass by using enzyme cocktails produced by a novel fungus *Aspergillus costaricensis* LS18. *Journal of Environmental Management*, 321, 115969. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115969>
24. Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., y Liu, Y. (2013). Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food microbiology*, 167 (2), 153-160.

25. Mattar, M.A., Soliman, S.S. y Al-Obeed, R.S. (2021). Effects of various quantities of three irrigation water types on yield and fruit quality of 'succary' date palm. *Agronomy*, 11(4), 796.
26. Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M. y Jiménez, M. (2005). Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A Production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and Other Members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Appl Env Microbiol*, 71 (8), 4696-4702.
27. Minikaev, D., Zurgel, U., Tripler, E. y Gelfand, I. (2021). Effect of increasing nitrogen fertilization on soil nitrous oxide emissions and nitrate leaching in a young date palm (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool) orchard. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 319: 107569.
28. Mirani, A.A., Teo, C.H., Markhand, G.S., Abul-Soad, A.A. y Harikrishna, J.A. (2020). Detection of somaclonal variations in tissue cultured date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using transposable element-based markers. *Plant Cell, Tiss and Org Cult*, 141, 119-130.
29. Nguyen, H.D.T., Jančič, S., Meijer, M., Tanney, J.B., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N. y Seifer, K.A. (2015). Application of the Phylogenetic Species Concept to *Wallemia sebi* from House Dust and Indoor Air Revealed by Multi-Locus Genealogical Concordance. *PLoS ONE*, 10 (3): e0120894. doi:10.1371/journal.pone.0120894
30. Nikolchina, I. y Rodrigues, P. (2021). A preliminary study on mycobiota and ochratoxin a contamination in commercial palm dates (*Phoenix dactylifera*). *Mycotoxin research*, 37, 215-220.
31. Othmani, A., Collin, M., Sellemi, A., Jain, S.M., Drira, N. y Aberlenc, F. (2017). First reported case of spontaneous hermaphroditism in female date palm (*Phoenix dactylifera* L.), cv 'Alligie'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92 (4), 376-388.
32. Olano, M. (2021). México quinto lugar en producción de dátil Medjool. Consultado: Diciembre de 2022. URL:

<https://revistalacampina.mx/2021/09/08/mexico-quinto-lugar-en-produccion-de-datil-medjool/>

33. Organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura (FAO). (2023). FAOSTAT: Top 10 Country Production of Dates, 2021. https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity
34. Ortiz-Uribe, N., Salomón-Torres, R. y Krueger, R. (2019). Date palm status and perspective in Mexico. *Agriculture*, 9(3), 46.
35. Palou L., Montesinos-Herrero C., Taberner V. y Vilella-Esplá, J. (2013). First report of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold of fresh date palm fruit (*Phoenix dactylifera*) in Spain. *Plant Disease*, 97 (6), 846-846.
36. Palou, L., Rosales, R., Taberner, V. y Vilella-Esplá, J. (2016). Incidence and etiology of postharvest diseases of fresh fruit of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the grove of Elx (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 55 (3), 391–400. <http://www.jstor.org/stable/44809317> Palou *et al.*, 2013.
37. Perini, L., Gostinčar, C. y Gunde-Cimerman, N. (2019). Fungal and bacterial diversity of Svalbard subglacial ice. *Scientific reports*, 9 (1), 20230.
38. Piombo, E., Abdelfattah, A., Danino, Y., Salim, S., Feygenberg, O., Spadaro, D., Wisnieswski, M. y Droby, S. (2020). Characterizing the fungal microbiome in date (*Phoenix dactylifera*) fruit pulp and peel from early development to harvest. *Microorganisms*, 8 (5), 641.
39. Quaglia, M., Santinelli, M., Suyolk, M., Onofri, A., Covarelli, L y Beccari, G. (2020). *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* species associated with dried date fruits collected in the Perugia (Umbria, Central Italy) market. *International Journal of Food Microbiology*, 332, 108585. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108585>
40. Rallo, P., Belaj, A., De La Rosa, R. y Trujillo, I. (2002). Marcadores moleculares.

http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm

41. Ramirez, A., Ramirez, A., Johnson, E. W. y Ladinig, A. (2022). El test ELISA Como Herramienta de Diagnóstico (1/2): Principios básicos. https://www.3tres3.com/es-mx/articulos/elisa-como-herramienta-de-diagnostico-1-2-principios-basicos_14135/
42. Rios, S. y Rethwisch. M. (2019). Current pest challenges in California date production. *California Fresh Fruit*. 14-16.
43. Salomón-Torres, R., Krueger, R., García-Vázquez, J. P., Villa-Angulo, R., Villa-Angulo, C., Ortiz-Uribe, N. y Samaniego-Sandoval, L. (2021). Date palm pollen: Features, production, extraction and pollination methods. *Agronomy*, 11(3), 504.
44. Salomón-Torres, R., Ortiz-Uribe, N. y Villa-Angulo, R. (2017). La producción de la palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.) en México. *Revista UABC*, 91.
45. Samaniego-Gómez, B.Y., Garruña R., Tun-Suarez, J.M., Moreno-Valenzuela, O.A.; Reyes-Ramirez, J.A.; Valle-Gough, R.E., Ail-Catzim, C.E. y Toscano-Palomar, L. (2021). Healthy Photosynthetic Mechanism Suggests ISR Elicited by *Bacillus spp.* in *Capsicum chinense* Plants Infected with *PepGMV*. *Pathogens*, 10(4), 455.
46. Samson, R.A., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, M.J. y Frisvad, J.C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50, 45-61.
47. Sancho, J.P. y Andrés, I.M. (2021). Biología de la palmera datilera. En: Usos artesanos e industriales de plantas en la Comunitat Valenciana. *Universidad de Valencia*. 92-97.
48. Sarraf, M., Jemni, M., Kahramanoğlu, I., Artés, F., Shahkoomahally, S., Namsi, A. y Rastogi, A. (2021). Commercial techniques for preserving date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit quality and safety: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28 (8), 4408-4420.

49. SIAP. (2023). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
50. Straatsma, G., François, A., y Simon, E.G.L.I. (2001). Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycological research*, 105 (5), 515-523.
51. Valle-Gough, R. E., Samaniego-Gómez, B. Y., Apodaca-Hernández, J. E., Chiappa-Carrara, F. X., Rodríguez-Dorantes, M., y Arena-Ortiz, M. L. (2022). RNA-Seq Analysis on the Microbiota Associated with the White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Different Stages of Development. *Applied Sciences*, 12(5), 2483.
52. Valle-Gough, R. E., Samaniego-Gómez, B. Y., Apodaca-Hernández, J. E., y Arena-Ortiz, M. L. (2020). The Use of Bioinformatic Tools in Symbiosis and Co-Evolution Studies. In *Metagenomics-Basics, Methods and Applications. IntechOpen*.
53. Varga, J., Frisvad, J.C., Kocsubé, S., Brankovics, B., Tóth, B., Szigeti, G. y Samson, R.A. (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol*, 69 (1):1-17. doi: 10.3114/sim.2011.69.01.
54. Wakil, W., Faleiro, J.R., y Miller, T.A. (Eds). (2015). Sustainable pest management in date palm: current status and emerging challenges. Springer.
55. Yuan, H.S., Lu, X., Dai, Y.C., Hyde, K.D., Kan, Y.H., Kušan, I. y Zhou, L.W. (2020). Fungal diversity notes 1277–1386: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity*, 104, 1-266.
56. Zadehdabagh, G., Rokni, N., Kiani, S., Goltapeh, M.E. y Danesh, R.Y. (2010). Evaluation of *Botrytis cinerea* isolates for virulence on rose cut flowers in greenhouse condition in Iran. *International Journal of Agricultural Technology*, 6 (3), 525-532.
57. Zaid, A. y Ouhabi, A. (2022). Mejhoul Variety: The Jewel of Dates—Origin, Distribution, and international markets. *Khalifa International*

Award for Date Palm and Agricultural Innovation. United Printing and Publishing, United Arab Emirates. 275 p.

58. Zalar, P., Sybren de Hoog, G., Schroers, H. J., Frank, J. M., y Gunde-Cimerman, N. (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (*Wallemiomycetes* and *Wallemiales*, cl. et ord. nov.). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87, 311-328.