

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL



Caracterización morfológica y molecular de
Colletotrichum spp. asociado al complejo de la
antracnosis de los cítricos en México

CHRISTHIAN ALVARADO UTRERA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

LA PRESENTE TESIS TITULADA: “**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE ESPECIES DE COLLETOTRICHUM SPP. ASOCIADO AL COMPLEJO DE LA ANTRACNOSIS DE LOS CÍTRICOS EN MÉXICO**” REALIZADA POR EL ALUMNO **CHRISTHIAN ALVARADO UTRERA** BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR INDICADO, HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

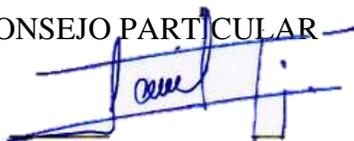
MAESTRO EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

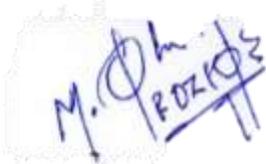
FIRMA



NOMBRE: Dr. Daniel Nieto Ángel

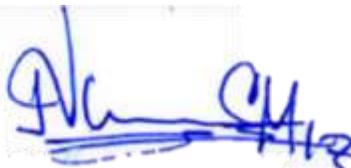
ASESOR

Dr. Mario Orozco Santos



ASESOR

Dr. Victor Conde Martinez



ASESOR

Dr. Jesus R. Torres García



Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo del 2015

RESUMEN

México ocupa el quinto lugar en producción de cítricos a nivel mundial, y estos son afectados por la antracnosis, enfermedad causada por especies del género *Colletotrichum*. En esta investigación, se realizaron aislamientos de *Colletotrichum* spp., recolectados de cítricos (naranja valencia, limón mexicano y limón persa) con síntomas de antracnosis en flor, hoja y rama. Se colectaron muestras de las regiones productoras de cítricos del Pacífico (Colima, Michoacán, Oaxaca) y del Golfo de México (Tabasco, Veracruz y Tamaulipas), que fueron utilizadas para caracterizar al patógeno a nivel morfológico y molecular. La identificación morfológica de los aislamientos se realizó en un medio sólido de papa-dextrosa-agar identificando el color de la colonia y midiendo el tamaño de los conidios; además se estudió el hábito de crecimiento de cada aislamiento. La caracterización molecular se realizó mediante la técnica de PCR con iniciadores específicos para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, utilizando CgInt y Calnt2, respectivamente, y combinados con el ITS4. Las colonias difirieron en su hábito de crecimiento y color, además se encontraron diferencias estadísticas en el tamaño de los conidios. La información está orientada en el conocimiento cuantitativo del patógeno que ataca a las especies cítricas y las regiones geográficas evaluadas. En la parte molecular se observó la identificación y presencia de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, presentándose en los tejidos de las especies cítricas estudiadas y de las regiones seleccionadas.

Palabras Claves.- Antracnosis, *Colletotrichum*, Cítricos, DNA, Iniciadores específicos.

ABSTRACT

Mexico ranks fifth in citrus production worldwide, and these are affected by anthracnose disease caused by species of *Colletotrichum*. In this study, isolates of *Colletotrichum* spp were performed., Collected from citrus (orange valencia, Mexican lemon and limes) with symptoms of anthracnose in flower, leaf and branch. Samples citrus producing regions of the Pacific (Colima, Michoacan, Oaxaca) and Gulf of Mexico (Tabasco, Veracruz and Tamaulipas), which were used to characterize the pathogen morphological and molecular levels were collected. Morphological identification of the isolates was carried out in a solid medium potato-dextrose agar identifying the color of the colony and by measuring the size of the conidia; further growth habit of each isolate was studied. Molecular characterization was performed by PCR with primers specific for *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, and Calnt2 Cglnt using, respectively, and combined with ITS4. Colonies differed in their growth habit and color, plus statistical differences in the size of the conidia. The information is aimed at quantitative knowledge of the pathogen that attacks citrus species and geographic regions evaluated. In molecular part identification and presence of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*, occurring in the tissues of citrus species studied and selected regions was observed.

Key words: Anthracnose, *Colletotrichum*, Citrus, DNA, Specific primers

DEDICATORIAS

Agradezco a Dios por permitirme estar en este mundo y por ser esa fuerza interior indispensable para poder luchar por mis metas y anhelos.

A mi madre por ser mi gran ejemplo de vida, por estar siempre cuando la necesito, darme los consejos y el apoyo incondicional necesario para salir adelante; alentándome con sus palabras, demostrándome que el trabajo, esfuerzo y constancia son las mejores armas para salir adelante.

A mi padre†, por ser mi gran ejemplo de vida, siguiendo sus pasos en la investigación, alentándome a que nunca me diera por vencido y que todo se puede cuando uno se lo propone, donde estás sabes que te dedico este gran logro.

A mi abuelo†, por darme las fuerzas y apoyo durante esta estancia, donde estás que te sientas orgulloso de mí.

A mi hijo, por ser mi fortaleza, mi alegría, por quien día a día sigo adelante y se lucha para tener más éxitos en la vida, por ser mi razón de mi existencia.

A mi familia que siempre estuvieron apoyándome, por su cariño y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por el gran apoyo recibido durante mi estancia de maestría

Al Dr. Daniel Nieto Ángel, por ser mi consejero y amigo, alentándome a continuar con este proceso de maestría, por otorgarme sus conocimientos y consejos en mi formación académica y la realización de la investigación. Por ser una gran persona a seguir.

Al Dr. Víctor Conde Martínez, por su gran apoyo en la realización de la investigación, sus valiosos conocimientos, su amistad y consejos que me permitieron seguir adelante.

Al Dr. Mario Orozco Santos por sus aportes y sugerencias en la mejoría del este trabajo.

Al Dr. Jesús R. Torres García por su apoyo en la realización de este trabajo, así como sus conocimientos y consejos.

A las personas, Dr. José L. Escamilla García, al M.C Manuel E. Ovando Cruz, Dr. Mario Orozco Santos, M.C Mario Rodríguez, Ing. Gewin Martínez, quienes me dedicaron un poco de su tiempo para la recolección de las muestras en los diferentes estados.

Al Ing. Rafael E. Müller García por sus consejos, comprensión, apoyo y valioso tiempo dedicado hacia mi trabajo y mi persona.

A M.C. Leticia Robles, M.C Luis Aguilar, por sus consejos, conocimiento y amistad en toda mi estancia en la maestría.

Dra. Sabina Velázquez, Biol. María del Carmen Zaragoza, a Gabriela González por su gran amistad, consejos y convivencia dentro del laboratorio de bioquímica.

A Verónica, Elvia y Oscar por sus consejos, ánimos, apoyos y su gran amistad que recibí durante mi estancia.

Mis compañeros y amigas que me apoyaron con su gran amistad, apoyo en los momentos más difíciles, compartiendo momentos de aprendizaje y distracciones.

A las personas que de alguna forma realizaron aportaciones hacia mi trabajo y mi persona.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION DE LITERATURA	5
2.1 Importancia de los cítricos	5
2.1.1 Naranja Valencia	6
2.1.2 Limón Mexicano	7
2.1.3 Limón Persa	9
2.2 El género <i>Colletotrichum</i>	9
2.2.1 Importancia	10
2.2.2 Taxonomía	11
2.2.3 Morfología	12
2.3 Rango de Hospedantes	12
2.4 Proceso de infección	14
2.5 Formas de penetración	16
2.6 Desarrollo y reproducción	16
2.7 Fuentes de inóculo	17
2.8 Condiciones que favorecen el desarrollo	18
2.9 <i>Colletotrichum acutatum</i>	18
2.10 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	20
2.11 Antracnosis de los cítricos (<i>Colletotrichum</i> spp.)	21
2.11.1 Antracnosis en limón mexicano	22
2.11.2 Sintomatología de la enfermedad	23
2.11.3 Epidemiología	24
2.12 Fenología del fruto	25

2.12.1 Caída de fruto pequeño	26
2.12.2 Síntomas de CFP	26
2.12.3 Epidemiología	27
2.13 Técnicas moleculares	28
2.13.1 Técnicas moleculares que han permitido identificar <i>Colletotrichum</i>	28
2.14 Marcadores moleculares	29
2.15 Reacción en Cadena de la Polimerasa	30
2.15.1 Electroforesis en gel	31
2.15.2 Agarosa	31
2.15.3 Marcador ADN	32
2.15.4 Tampón de carga	32
3. MATERIALES Y METODOS	34
3.1 Ubicación Geográfica	35
3.1.1 Recolección de muestras	35
3.2 Recolección del patógeno	36
3.3 Fase de laboratorio	36
3.4 Aislamiento de <i>Colletotrichum</i> spp. del material vegetal	36
3.5 Caracterización morfológica de <i>Colletotrichum</i> spp.	38
3.6 Extracción de ADN	38
3.7 Cuantificación de ADN de <i>Colletotrichum</i> spp.	39
3.8 Electroforesis en gel de agarosa	39
3.9 Amplificación del ADN mediante PCR	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Muestreo de <i>Colletotrichum</i> spp.	41
4.2 Caracterización morfológica de <i>Colletotrichum</i> spp.	41

4.2.1 Medición de colonias	44
4.2.2 Medición de conidios	48
4.3 Caracterización molecular	50
4.3.1 Extracción de ADN genómico de <i>Colletotrichum</i> spp	50
4.3.2 Amplificación de las muestras	50
5. DISCUSION	53
6. CONCLUSIONES	56
7 LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1. Estados productores de limón mexicano en México, producción de fruta y su valor en el año 2013. 7
- Cuadro 2. Estados productores de limón mexicano en México, producción de fruta y su valor en el año 2013. 8
- Cuadro 3. Numero de aislamientos, origen, parte vegetativa y la especie citrícola de donde se obtuvieron los aislamientos. 34
- Cuadro 4. Características de las colonias de *Colletotrichum* spp. Obtenidas de tejidos de limón mexicano, limón persa y naranja valencia. 41
- Cuadro 5. Crecimiento en medio de cultivo en papa-dextrosa-agar de *Colletotrichum* spp. colectados en cítricos de las diferentes regiones en México. 46
- Cuadro 6. Tamaño y forma de conidios Se presenta el tamaño promedio de conidios (μ) de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* su hospedante y las muestras resultantes. 48
- Cuadro 7. Amplificación de *Colletotrichum*. Se muestran el número de aislamientos amplificados por estado la especie citrícola obtenida y el patógeno que fue amplificado. 51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum</i> spp.	15
Figura 2. Estrategias de infección de <i>Colletotrichum</i> .	17
Figura 3 Estados donde se realizó el muestreo de las dos regiones citrícolas	34
Figura 4. Síntomas de antracnosis en tejidos	40
Figura 5. Morfología de colonias sembradas después de tres días.	43
Figura 6. Medición de las colonias en los días 3, 6 y 9 días, que fueron utilizadas para su medición, <i>Colletotrichum acutatum</i> aislado de flor en naranja valencia, en el edo. de Veracruz.	44
Figura 7. Medición de las colonias en los días 3, 6 y 9 días, que fueron utilizadas para su medición, <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado de flor en limón persa, en el edo. de Tamaulipas.	44
Figura. 8. Medición de las colonias en los días 3, 6 y 9 días, que fueron utilizadas para su medición, <i>Colletotrichum acutatum</i> aislado hoja en limón mexicano, en el edo. de Colima.	44
Figura 9. Medición de conidios de <i>C. gloeosporioides</i> presentes en hoja de limón mexicano de Oaxaca y de <i>C. acutatum</i> obtenidos de flor de naranja aislado de Veracruz.	47
Figura 10. Amplificación de PCR específica para la identificación de <i>Colletotrichum</i> spp. Obtenidos de los tejidos vegetativos, observando las bandas de las amplificaciones de las muestras <i>C. acutatum</i> aislado de Flor en naranja valencia en el edo. de Veracruz.	50
Fig. 11. Amplificación de PCR específica para la identificación de <i>Colletotrichum</i> spp. Obtenido de los tejidos vegetativos, observando las bandas de las amplificaciones de las muestras <i>C. gloeosporioides</i> aislado de Flor en Oaxaca en limón mexicano.	50

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. ASOCIADO AL COMPLEJO DE ANTRACNOSIS DE LOS CÍTRICOS EN MÉXICO

1. INTRODUCCION

El género *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*) contiene un número diverso de hongos, incluyendo tanto patógenos de plantas como saprófitos. Las especies patógenas son importantes en todo el mundo, ya que causan las enfermedades conocidas comúnmente como antracnosis de gramíneas, leguminosas, hortalizas, frutas y otros cultivos de árboles perennes. La enfermedad puede ocurrir en hojas, tallos y frutos de la planta huésped. Las enfermedades de antracnosis aparecen en ambos tejidos de las plantas en desarrollo y maduros (Svetlana *et al.*, 2010).

Las enfermedades conocidas como antracnosis de los cítricos (*Citrus* spp.) son causadas por hongos del género *Colletotrichum*, consideradas un serio problema en regiones con características de clima tropical y subtropical (Jeffries *et al.*, 1990).

Las enfermedades causadas por hongos patógenos disminuyen la producción de los cultivos citrícolas, entre las que se encuentran la enfermedad denominada “Caída del fruto pequeño” (CFP), antracnosis en limón mexicano y antracnosis en postcosecha cuyo agente causal se ha reportado que es el hongo *Colletotrichum acutatum* (Brown *et al.*, 1996; Timmer *et al.*, 1994) de las cuales las dos primeras ocasionan daños importantes en la producción de fruta en varias especies de cítricos en México (Orozco-Santos, 2001). Este patógeno infecta a flores, induce abscisión del fruto y el resultado en la pérdida de rendimiento, en muchas variedades de cítricos (Brown *et al.*, 1996).

C. acutatum presenta esporulación de color naranja, es de lento crecimiento y produce antracnosis de limón mexicano (Brown *et al.*, 1996). El hongo que produce la antracnosis de postcosecha corresponde a *C. gloeosporioides* (Agostini *et al.*, 1992).

Las especies de *Colletotrichum* emplean diversas estrategias para invadir al hospedero, desarrollan una serie de estructuras especializadas de infección: tubos germinativos, apresorios y ganchos de penetración. Las primeras etapas de desarrollo del hongo en la superficie de la planta, son esencialmente iguales para todas las especies de este género (O'Connell *et al.*, 2000).

Colletotrichum presenta conidios elongados, hialinos, aseptados (excepto antes de germinar pueden formar un septo), producidos enteroblásticamente en fiálides cilíndricas y hialinas. Los apresorios son de color café; pero pueden ser de borde entero, crenado e irregular y simple o con germinación múltiple para producir columnas complejas de varios apresorios, sus conidios son liberados y se diseminan solo cuando los acérvulos se encuentran húmedos (Herrera y Ulloa, 2004).

Los estudios de caracterización morfológica, patogénica y genética de los patógenos generan información que permiten diseñar estrategias de manejo para el control de enfermedades (Agostini *et al.*, 1992).

La aplicación de marcadores moleculares en la taxonomía de hongos promete aclarar las relaciones genéticas entre grupos de hongos fitopatógenos. Esto es especialmente importante en taxones como *Colletotrichum*. El número de especies de pertenecientes a este género es aun interrogante (O'Neill, *et al.* 1997).

Se han encontrado diferencias entre *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* mediante técnicas moleculares y criterios morfológicos. Las principales características morfológicas, altamente variables y subjetivas, utilizadas para distinguir *C. acutatum* de *C. gloeosporioides* y otras especies de *Colletotrichum*, son la forma de los conidios, la baja tasa de crecimiento, el color

de la colonia y la secreción de pigmentos rojos o rosados al medio de cultivo (Freeman *et al.*, 2001, Sreenivasaprasad y Talhinhos, 2005).

El uso de técnicas moleculares y los avances en estudios de taxonomía y epidemiología permitieron la identificación de *C. acutatum* como causante de antracnosis en varios casos en los que se consideraba a *C. gloeosporioides* como el agente causal (Freeman *et al.*, 2001). Mediante métodos modernos la fitopatología logra un correcto diagnóstico de enfermedades relacionadas con *Colletotrichum*, esto permite desarrollar alternativas de manejo apropiado de la enfermedad, minimizando costos de producción y mejorando la calidad de frutos (Rodríguez, 2007).

Las herramientas moleculares son efectivas para distinguir entre especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Se han utilizado exitosamente iniciadores específicos para *C. acutatum* (Cglnt o Calnt2) combinados con el iniciador universal ITS4 para la detección del patógeno Sreenivasaprasad *et al.*, 1996 y Schiller *et al.*, 2006). Para la determinación de la especie, se realizó amplificación de la región ITS, utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el iniciador del gen ADNr 5.8S ya que permite la identificación del patógeno (Salazar *et al.* 2012).

C. gloeosporioides tiene la habilidad de infectar a un mayor número de tejidos vegetales en comparación de *C. acutatum*, ya que la primera especie es capaz de causar síntomas en brotes, hojas, flores y frutos en su hospedante principal, mientras que la otra es patogénica para flores, hojas, frutos, brotes y es causante de antracnosis de limón mexicano, existen diferencias en patogenicidad a especies cítricas y diferencias en características culturales de las colonias (Brown *et al.*, 1996; Orozco-Santos, 2006).

El patógeno causante de la antracnosis conocido como *Colletotrichum* spp. tiene gran variabilidad morfológica, e inestabilidad en pruebas bioquímicas (Rodríguez, 2007).

En México, *C. acutatum* ataca naranja, toronja y limón persa, en la región de Golfo de México; que se caracteriza por ser un región húmeda, en cambio, *C. gloeosporioides* es muy

importante en limón mexicano en el área de la región del pacífico mexicano, perteneciente al trópico seco. En la información presentada, son evidentes las diferencias en morfología entre ambas especies (Orozco-Santos, 2006).

Para esto se plantea la siguiente hipótesis donde existe variación morfológica y genética entre las poblaciones de *Colletotrichum*, en las regiones productoras de cítricos de la costa del Pacífico y la región de la costa del Golfo de México.

Con base en lo anterior, se plantean objetivos siguientes:

- Identificar la presencia de las poblaciones de *Colletotrichum* presentes en el complejo de antracnosis en los estados citrícolas de la costa del Pacífico y del Golfo de México mediante la técnica de PCR y Primer específicos.
- Caracterizar morfológicamente las poblaciones de *Colletotrichum* spp. en el complejo de cítricos procedentes de las regiones citrícolas de la costa del Pacífico y Golfo de México
- Establecer una colección de referencia de cepas del hongo *Colletotrichum* spp. asociadas al complejo de la antracnosis en cítricos.

2. REVISION DE LITERATURA

Los cítricos pertenecen a la clase *Angiospermae*, subclase dicotiledónea, orden rutae, familia rutácea y al género *Citrus*, y algunas especies que se destacan por su importancia comercial son: naranja [(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)], mandarina (*Citrus reticulata*), Limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle), limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) y la toronja (*Citrus paradisi* Macfadyen), entre otros. Los cítricos son originarios de las áreas subtropicales y tropicales de Asia, considerándose China como el centro de origen. La naranja dulce fue el primer cultivo de cítricos introducido al continente americano por los primeros colonizadores, en Sudamérica fue introducido a Brasil y en América del Norte a México (Albrigo y Devices, 1999)

La citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional, los cítricos producidos en México son: naranja, limón mexicano, limón persa, toronja, mandarina. A nivel mundial, ocupa el quinto lugar por la superficie establecida y su producción (SIACON, 2006).

2.1 Importancia de los cítricos

El género *Citrus*, cuyo término común es cítrico, designa las especies de grandes arbustos o árboles perennes (entre 5 y 15 m), cuyos frutos o frutas de la familia rutaceae poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, él les proporciona ese sabor ácido tan característico. Este género oriundo del Asia tropical y subtropical está conformado por tres especies y numerosos híbridos cultivados, incluyendo las frutas más ampliamente comercializadas, como el limón, la naranja, la lima, el pomelo y la mandarina, con diversas variedades que dependen de la región en la que se cultive cada una de ellas. El fruto característico de las especies del género *Citrus*, es un hesperidio (Mabberley, 1997).

En 1997, Mabberley propuso una clasificación pragmática de los principales cítricos cultivados, con el objetivo de aclarar el caos que muchas veces existe al consultar diferentes fuentes. Esta clasificación simplifica y aclara el género, además de que parece contar con el

consenso de los principales de *Citrus*: *C. máxima* (Burm), *C. medica* Mill y *C. reticulata*, siendo todas las restantes híbridos de estas tres. Esta clasificación solo hace referencia a los cultivados, no al resto de especies de este género.

Los cítricos son el principal cultivo frutal del mundo, con una superficie cultivada superior a 8.6 millones de hectáreas y una producción de casi 124 millones de toneladas en el 2010, superando a cultivos como el banano, las manzanas o la vid (FAOSTAT, 2012).

México es un gran productor a nivel mundial de cítricos y la citricultura representa una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional. Se tiene una superficie establecida de 581 mil hectáreas, de las cuales el 60.7% corresponde a naranja, 29.5% a limón mexicano, 5.4% a limón persa, y el resto a toronjas, mandarinas y tangerinas (SIAP 2013.).

2.1.1 Naranja Valencia

En México, la naranja es la especie con mayor superficie y producción a nivel nacional, la producción se destina al mercado en fresco; esto se debe a la deficiente calidad externa de la fruta producida y a que Estados Unidos es exportador neto de fruta en fresco. El 25% de la producción de naranja se exporta como jugo congelado y concentrado (Schwentenius y Gómez, 2005).

La naranja es considerada como una de las frutas de mayor importancia en el país, tanto por la superficie destinada para su cultivo, como para la producción (Cuadro 1) y el consumo *per cápita*, que es cercano a 40 Kg. Sus características nutricionales ayudan al fortalecimiento de las defensas del organismo, debido a su contenido de vitaminas C, B1, B2, B5, B6 y E; sales minerales, ácidos orgánicos, pectina, componentes que fortalecen a la circulación y propiedades anticancerígenas del estómago. La cáscara y la flor se utilizan para la elaboración de medicina naturista para bronquitis (COVECA, 2011).

Las flores son comúnmente conocidas con el nombre de azahares del árabe azahar que significa flor; son de color blanco o teñidas de rojo purpura; generalmente hermafroditas y

pueden nacer solitarias o en racimos, en los terminales o en las axilas de las hojas. Estructuralmente las flores son completas y constan de:

- Un cáliz en forma de copa, con tres a cinco sépalos de color verde.
- Una corola de cuatro a ocho pétalos blancos, elípticos, más largos que los sépalos.
- El androceo de 20 a 60 estambres. Las anteras encierran un polen amarillo brillante.
- El gineceo es libre y su pistilo está compuesto por el estigma, el estilo y un ovario.
- El ovario es elipsoidal y polícarpelar, sincárpico y tiene entre 8 y 18 cavidades (Amórtegui *et al.* 2001).

Cuadro 1. Estados productores de naranja valencia en México, producción de fruta y su valor en el año 2013.

Estado	Superficie (Ha)	Producción (Ton/Ha)	Valor de la producción (miles de \$)
Veracruz	164,554	2,143,561	2,452,488
San Luis Potosí	38,775	402,194	492,582
Tamaulipas	31,687	747,870	760,877
Nuevo León	25,765	294,163	437,223
Tabasco	8,187	81,695	186,657
Otros	65,690	740,484	1,182,431
Total	334,658	4,409,967	5,512,258

Fuente: Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). SAGARPA. 2013

2.1.2 Limón Mexicano

El limón mexicano también conocido como: Mexican lime, Key lime, limón criollo, es en realidad una lima ácida de frutos pequeños y es una de las especies cítricas presente en los estados de Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca de importancia económica en México.

El limón es una planta que crece, florece y fructifica prácticamente todo el año. Sin embargo las condiciones climáticas y el manejo del huerto influyen fuertemente sobre los hábitos de crecimiento del árbol. En los últimos años la superficie de este cultivo se ha incrementado;

sin embargo, durante mucho tiempo los rendimientos han permanecido bajos debido a problemas de diversa índole y a la falta de tecnología de producción (Medina *et al.*, 2001).

México es el primer productor de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* Christm. (Swingle)] en el mundo. En el año 2013 se registró una superficie de 169,522 hectáreas con una producción de 2,120,612 millones de toneladas anuales con un valor de 6,510 millones de pesos. Las principales áreas productoras de limón mexicano se localizan en la región costera de los estados de Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Cuadro 2). Este cítrico se adapta ampliamente a las áreas que presentan características de clima tropical seco, en donde predomina un amplio período de secas (7 a 8 meses) y una época lluviosa corta (4 a 5 meses). La precipitación ocurre principalmente en el verano y fluctúa entre 700 a 1,200 mm anuales, temperatura media anual de 26 a 28 °C y de 0 a 400 metros sobre el nivel del mar (Orozco-Santos *et. al.*, 2006).

Cuadro 2. Estados productores de limón mexicano en México, producción de fruta y su valor en el año 2013.

Estado	Superficie (Ha)	Producción (Ton/Ha)	Valor de la producción (miles de \$)
Michoacán	43,819	518,598	1,882,063
Oaxaca	21,024	195,424	498,380
Colima	19,522	269,555	932,012
Guerrero	6,877	73,779	185,814
Jalisco	5,063	59,120	205,527
Tamaulipas	4,049	76,711	277,359
Otros	69,168	927,425	3,981,157
Total	169,522	2,120,612	6,510,201

Fuente: Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). SAGARPA. 2013

2.1.3 Limón Persa

El limón Persa (*Citrus Latifolia* Tanaka) es una lima ácida, conocida en México como “limón sin semilla” y en Estados Unidos como “lima de Persia” (Persian lime) o “lima de Tahití” (Tahitian lime) (Espinosa, 1992); es un híbrido producido entre *Citrus aurantifolia* con alguna otra especie de *Citrus*; es un fruto oblongo a ovoide, con una papila terminal ancha no muy pronunciada, de 3.8 a 6.6 cm de largo e incluso mayor, de color amarillo brillante al madurar, con ligeras rugosidades con 8 o 10 segmentos, ácido, de producción media y preferido por su buena calidad para exportar como fruta fresca (Gómez *et al*; 1994).

2.2 El género *Colletotrichum*

Sutton en 1992 establece que el taxón se encuentra constituido por 39 especies de *Colletotrichum* entre saprofitos y parásitos. Las especies patogénicas han causado serias pérdidas en un amplio número de cultivos perennes en regiones tropicales y subtropicales debido a la presencia de lesiones causadas por la antracnosis.

Los hongos del genero *Colletotrichum* constituyen un interesante campo de estudio, y su ámbito más frecuente en que se encuentra mayor riqueza, es el que tiene que ver con su papel de patógeno de plantas (Correa *et al.*, 2007)

Este género y su teleomorfo *Glomerella* se han relacionado con enfermedades de plantas en todo el mundo, pero especialmente como la causa de problemas en precosecha y postcosecha (Sutton, 2004). Causa daños en raíces, ramas, hojas, flores y frutos, pero con frecuencia son sumamente específicos a cierto tejido, especie de planta o cultivo (Bailey *et al.*, 2004). Existe una considerable variación en los tipos de plantas hospederas a las que cada especie de este género puede atacar.

Colletotrichum está implicado en enfermedades de plantas especialmente con antracnosis alrededor del mundo. Además, por tener la habilidad para causar infecciones latentes, se ha ubicado entre los patógenos más importantes en campo y en postcosecha (Bailey y Jeger,

1992). El género *Colletotrichum* fue establecido por Corda en 1831 para referirse como un hongo que se caracteriza por presentar conidios hialinos, curvos y fusiformes, y un acérvulo con setas. Este género presenta un número diverso de especies que incluyen los patógenos y los saprofitos. Las especies del género son consideradas como las más exitosas dentro de los hongos patógenos de plantas y se presentan tanto en zonas templadas como tropicales. Este patógeno puede afectar gran parte de los tejidos, órganos de la planta en desarrollo, y frutos. Su capacidad para causar infecciones latentes o quiescentes lo ubican dentro de los patógenos de postcosecha más importantes. (Jeffries *et al.*, 1990).

2.3 Importancia

Esta enfermedad se encuentra distribuida a escala mundial y ocasionan pérdidas económicas en pre y postcosecha en regiones tropicales, subtropicales y de clima templado (Jeffries *et al.*, 1990; Bailey y Jeger, 1992). Sus hospedantes incluyen una gran diversidad de cultivos anuales como leguminosas (frijol, soya, chícharo y leguminosas forrajeras) (Lenné, 1992), gramíneas (maíz y sorgo) (Nicholson, 1992), solanáceas (tomate, chile y papa) (Dillard, 1992) cucurbitáceas (melón, sandía y pepino) (Sitterly Keinath, 1996). Asimismo, diversas especies de *Colletotrichum* se han reportado afectando un gran número de cultivos perennes como aguacate, plátano, cítricos, café, mango, papaya, guayaba, guanábana, cacao, hule, manzana, durazno y almendro, así como cultivos industriales: algodón, caña de azúcar y tabaco (Jeffries *et al.* 1990; Dodd *et al.* 1992; Waller, 1992; Freeman *et al.* 1998).

Las especies de hongos fitopatógenos del género *Colletotrichum* presentan una amplia distribución en todos los continentes. Los agrónomos fitopatólogos lo consideran como uno de los patógenos más importantes en la agricultura, debido a la diversidad de especies vegetales que pueden ser afectadas y la magnitud de los daños ocasiona sobre las plantas (Femenia, 2007).

Jeffries *et al.* (1990), distinguieron varias formas patogénicas basadas en los hospederos específicos y características culturales, por otra parte Mass (1983), utilizó el criterio de patogenicidad para diferenciar aislamientos de *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. coccodes*,

C. trifolii, *C. dematium*, *Glomerella cingulata* y *Gloeosporium* spp. y observó que la patogenicidad varió con el aislamiento y el tejido inoculado

La infección por *Colletotrichum* es la causa directa de enfermedades de las plantas; sin embargo, el hongo se presenta también como saprofito o invasor secundario de tejidos en decadencia. Las pérdidas causadas por antracnosis ocurren principalmente como una reducción directa de la cantidad y calidad del producto cosechado (Jeffries *et al.* 1990; Bailey y Jeger, 1992).

2.2.2 Taxonomía

El nombre científico de un organismo es la clave para la búsqueda de su literatura y también es importante para muchos aspectos de la ciencia de la cual forma parte. Los micólogos, biólogos, fitomejoradores, fitopatólogos y extensionistas requieren de precisión en la aplicación de nombres a los organismos con los cuales trabajan, esto con el propósito de lograr una comunicación efectiva al hablar de un determinado patógeno (Sutton, 1992). *Colletotrichum* es un género notoriamente variable, sobre el cual existen muchas preguntas fundamentales relacionadas con su taxonomía, evolución, origen de variación, especificidad hospedera y mecanismos de patogenicidad (Bryson *et al.* 1992).

Según el NCBI, 2007 (National Center for Biotechnology Information) la clasificación taxonómica del Género *Colletotrichum* es:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Sordariomycetes incertae sedis

Orden: Phyllachoraceae

Familia: Phyllachoraceae

Subfamilia: Phyllachoraceae mitosporicos

Género: *Glomerella* (anamorfo: *Colletotrichum*)

2.2.3 Morfología

Este género presenta un micelio enramado, toma una coloración que varía desde hialina hasta castaño pálido. Los acérvulos son separados en forma de disco. (Barnett 1998,). *Colletotrichum* spp, tiene diferente forma de comportamiento pudiendo ser saprófito y llegar a ser completamente patógeno, teniendo un amplio rango de hospederos. Los conidios al ser producidos en masas mucilaginosas por lo general son de color rosado y tiene un contorno irregular en las lesiones necróticas sobre frutos, hojas y demás tejido de una planta siendo esta la evidencia de antracnosis (Contreras, 2006).

El género *Colletotrichum*, morfológicamente presenta conidios elongados, hialinos, (7- 20 x 2.5-5 μm), aseptados (excepto antes de germinar pueden formar un septo) producidos enteroblásticamente en fiálides cilíndricas y hialinas, unicelulares y fusiformes que se encuentran ubicadas en una estructura reproductiva llamada acérvulo (500 μm de diámetro). Estos cuerpos son en forma de disco, cerosos, sub epidermales. Además de conidióforos y conidios, el hongo presenta setas en el borde del acérvulo o entre conidióforos, aunque a veces están ausentes (Bailey y Jeger, 1992; Herrera y Ulloa, 2004).

2.3 Rango de hospedantes

Las enfermedades causadas por *Colletotrichum* spp. se presentan en un amplio rango de hospedantes distribuidos a nivel mundial, registrándose tanto en como en precosecha y postcosecha (Contreras, 2006).

La antracnosis producida por el hongo *Colletotrichum*, es reconocida como la enfermedad más importante. Su presencia se caracteriza por la aparición de manchas oscuras en las hojas, flores y pedúnculos. Adicionalmente, los frutos pueden ser afectados, particularmente en la etapa de cuajado, pudiendo sufrir daños en los frutos llegando a la madurez. La incidencia en

los frutos maduros dificulta su comercialización, este hongo puede atacar a diversos tejidos de las plantas, dependiendo la especie de *Colletotrichum* y el hospedante (Contreras, 2006).

Existen numerosos casos que han reportado que varias especies de *Colletotrichum* o biotipos están asociadas a un solo hospedante. Por ejemplo la antracnosis del mango causada por *C. gloeosporioides* afecta a la fruta sobre todo en postcosecha (Freeman y Shabi, 1996). En el caso de fresa puede estar infectado por tres especies de *Colletotrichum*, *C. fragarie*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, que causa la antracnosis de la fruta y otras partes de la planta. (Howard *et al.*, 1992).

Las principales especies de *Colletotrichum* que atacan leguminosas de grano son: *C. lindemuthianum*, *C. truncatum*, *C. destructivum* y *C. gloeosporioides*. El primero afecta frijol, chícharo de vaca y algunas leguminosas de grano pequeño de los géneros *Phaseolus* y *Vigna*, soya y chícharo. *C. truncatum* posee un amplio rango de hospedantes, entre los que se citan: soya, chícharo de vaca, frijol lima, cacahuete y lentejas. *C. destructivum* infecta soya y lenteja y finalmente *C. gloeosporioides* se reporta en chícharo, soya y cacahuete (Orozco-Santos, 2006).

La antracnosis del plátano es de distribución mundial y se considera una importante enfermedad de este frutal. Esta es causada por *C. musae*. Los síntomas en frutos maduros (amarillentos) se presentan como manchas de color café, hundidas y cubiertas con masas de esporas de color naranja o salmón. Las lesiones aumentan de tamaño al avanzar la maduración y pueden eventualmente coalescer. En la punta del fruto, se desarrolla una pudrición que llega a descomponer la pulpa completa. En frutos verdes, los síntomas se desarrollan sobre heridas producidas en su cascara. Las lesiones maduras son de color café obscuro a negro. Los frutos enfermos maduran más rápidamente que los frutos sanos (Jones y Slabaugh, 1994).

C. gloeosporioides es causante de la antracnosis de la papaya de frutos en post cosecha en regiones tropicales y subtropicales, este hongo produce síntomas en forma de manchas

redondas, hundidas y acuosas en frutos maduros, las cuales llegan a medir hasta cinco centímetros de diámetro. En el centro de las lesiones se forman masas conidiales de color naranja rosado que son frecuentemente producidas en un patrón de anillos concéntricos. Otro tipo de síntomas consiste en manchas irregulares a circulares, ligeramente deprimidas y de color café rojizo. Este tipo de daño se conoce como “mancha de chocolate” y al madurar la fruta crecen rápidamente para formar lesiones de apariencia circular y hundida (Orozco-Santos, 2006).

2.4. Proceso de infección

El proceso de infección de *Colletotrichum* spp. involucra una secuencia de eventos (Dodd *et al.*, 1989). El inoculo en la mayoría de los casos llega a su hospedero por medio del agua o por dispersión de los conidios que se adhieren a la cutícula de la planta y germinan en un periodo de un día, produciéndose el tubo germinal cuyo tamaño oscila entre 10-20 μm , antes de formar el apresorio terminal, que directamente penetra la cutícula, las dos fuentes de inoculo son los conidios y las ascosporas producidos en acérvulos y peritecios, respectivamente. Las dos fuentes de infección que utiliza *Colletotrichum* spp., es la colonización intracelular, o la colonización intra mural sub cuticular (Figura 1) (Agrios, 2005).

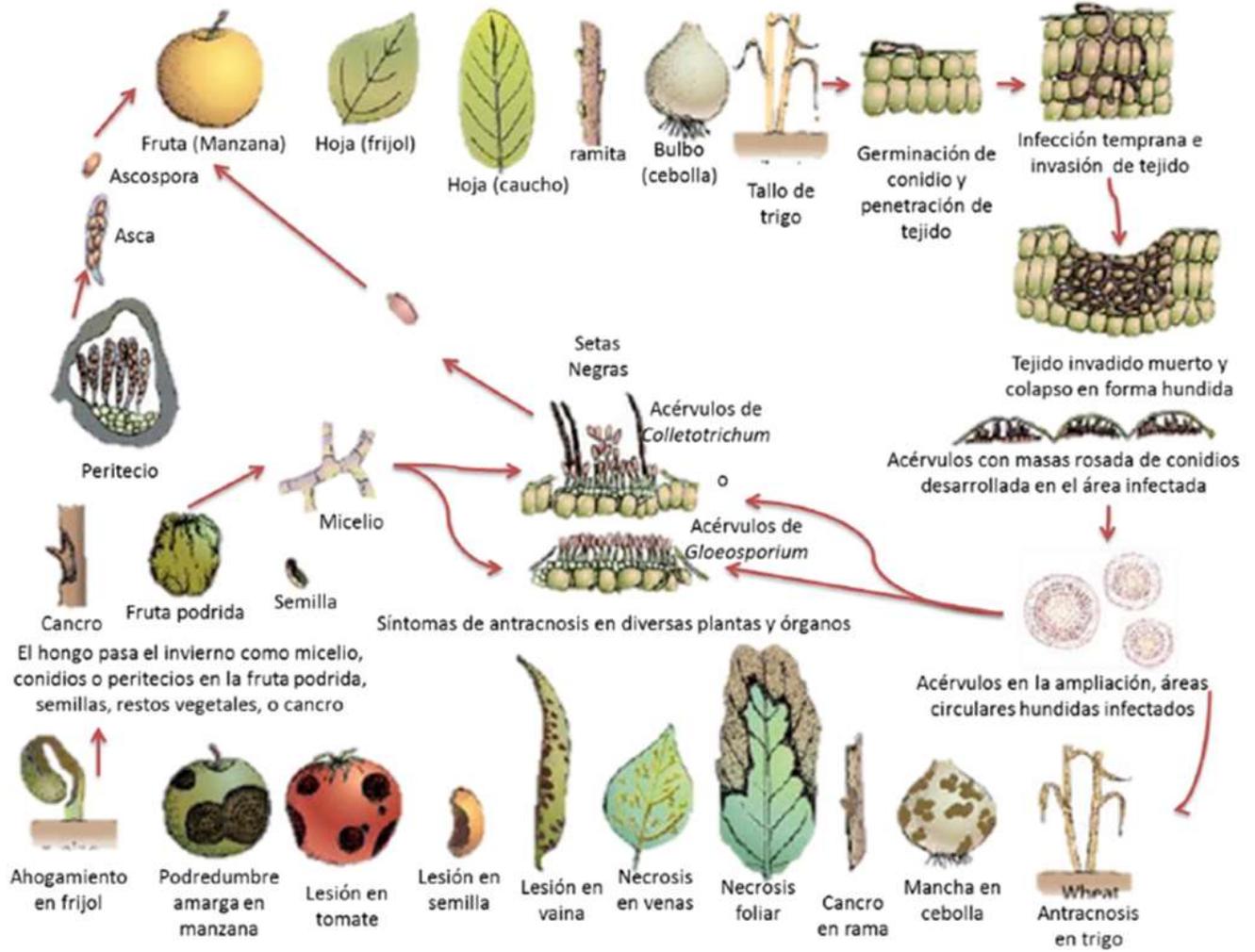


Figura 1. Ciclo de vida de *Colletotrichum* (Agris 2005).

2.5 Formas de penetración

Las especies de *Colletotrichum* emplean diversas estrategias para invadir al hospedero, desarrollan una serie de estructuras especializadas de infección: tubos germinativos, apresorios y ganchos de penetración (Contreras, 2006).

Colletotrichum spp ingresa a su hospedante a través de aperturas naturales como los estomas, a través de heridas, o por penetración directa de la barrera circular, siendo esta la forma más común. Después de este proceso el crecimiento de *Colletotrichum* spp. se restringe en la capa epidérmica, presentándose así un periodo de latencia. Cuando los frutos maduran producen tejidos que promueven en la reactivación del patógeno, produciéndose de esta manera la enfermedad (Contreras, 2006).

2.6 Desarrollo y reproducción

Las primeras etapas de desarrollo del hongo en la superficie de la planta, son esencialmente iguales para todas las especies de este género (O'Connell *et al.*, 2000)

Cuando los tejidos de la planta son colonizados exitosamente por *Colletotrichum*, por medio de infección hemibiotrófica y/o intramural, el patógeno crece activando un comportamiento necrotrófico clásico. La fase necrotrófica es responsable de los síntomas de la antracnosis que es típico de las especies de *Colletotrichum*. Durante este estado el patógeno crece exactamente a través del tejido hospedero, dentro de las células, en las paredes, a través de las paredes y en espacios intercelulares. (Mendgen *et al.*, 2002).

Pese a la dispersión y la destrucción de los tejidos, otro aspecto importante y raramente conocido de la fase de crecimiento necrotrófica es que las cutículas de los frutos afectados permanece intacta, sugiriendo las cutinasas están involucradas en la penetración inicial de la superficie de la planta, entonces la subsecuente síntesis y/o actividad de estas enzimas debe ser inhibido. Una cutícula intacta puede tener varias funciones. Esta puede actuar para mantener el patógeno dentro del tejido infectado, pero es de mayor importancia, el papel aún

no definido en la reproducción de *Colletotrichum*. La producción tanto del acérvulo como del peritecio sobre la superficie de la planta requiere una cutícula intacta (Figura. 2) (Mendgen *et al.*, 2002).

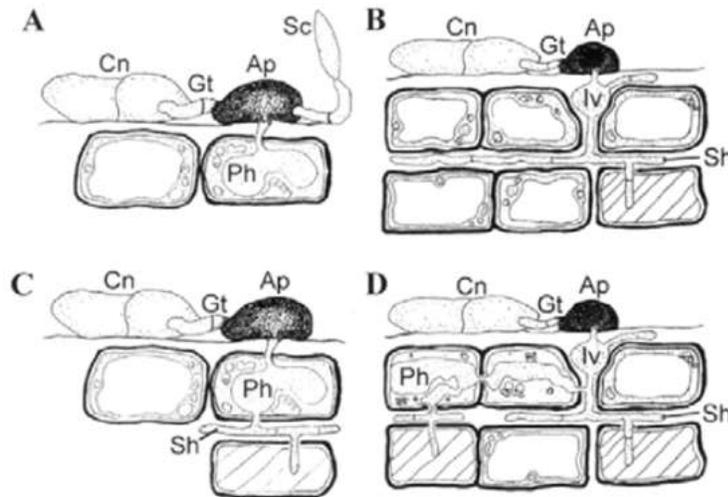


Figura 2. Estrategias de infección de *Colletotrichum*. A, crecimiento biotrófico. B, desarrollo necrotrófico intramural, subcuticular. C, interacción hemibiotrófica. D, desarrollo intra e intercelular y hemibiotrófico subcuticular. Cn= conidio; Gt= tubo germinal; Ap= apresorio; Iv= hifa infectiva; Ph= hifa primaria; Sh= hifa secundaria; Sc= conidio secundario. Las células muertas se representan con líneas diagonales. (Adaskaveg *et al.*, 2005)

2.7 Fuentes de inóculo

En acérvulos y peritecios jóvenes, los conidios y ascosporas están encerradas en un material húmedo mucilaginoso (matriz), la cual es un complejo mixto, compuesto en su mayoría por polisacáridos, glicoproteínas y en su minoría por algunas enzimas. Cuando esta estructura reproductiva madura se encuentra bajo condiciones secas, la matriz forma una corteza dura, la cual mantiene a las esporas juntas (Bailey *et al.*, 1992).

2.8 Condiciones que favorecen el desarrollo de *Colletotrichum*

El proceso infectivo que desarrolla el patógeno causante de la Antracnosis es favorecido por altas precipitaciones, alta humedad ambiental y altas temperaturas. Sin embargo, es obvio que cada uno de esos componentes deben estar presentes en niveles óptimos en forma simultánea, ya que con uno solo de ellos que no esté en el rango requerido por el patógeno se afecta negativamente el proceso de infección (Kranz *et al.*, 1982).

La humedad en forma de salpicaduras de lluvia y agua corriente tiene una función importante sobre la distribución y diseminación de conidios de *Colletotrichum*. Sobre la misma planta o de una planta a otra (Agrios, 1995). El agua es el principal agente diseminador de conidios de *Colletotrichum*. Mientras que la lluvia es la principal fuente de agua. Los conidios con ayuda del mucílago hidrofílico en el que se forman son arrastradas desde las partes vegetativas hasta los órganos florales y frutos.

Los suelos en los que debido a las malas prácticas culturales, o que por sus condiciones tienen una profundidad de suelo explorable por las raíces muy reducidas, en torno a los 40 o 50 cm de profundidad, los árboles no se desarrollan bien y tienen pocas hojas y poco desarrolladas. En estas condiciones los frutos no se encuentran protegidas por las hojas, aumentando los golpes y las heridas y con ello aumenta el riesgo de infección por hongos.

2.9 *Colletotrichum acutatum*

Colletotrichum acutatum puede afectar a la mayoría de las partes de la planta, desde la raíz hasta las hojas, flores, ramas y frutos, causando enfermedades como pudrición de la corona de la raíz, la defoliación, tizón flor, y la pudrición de la fruta. Sin embargo, como para la mayoría de especies de *Colletotrichum*, que se incurre en pérdidas más significativas debido a la infección por *C. acutatum* cuando se ataca la fruta. Hay dos tipos distintos de

enfermedades que ocasiona *Colletotrichum* a la fruta, los que causan la enfermedad en la fruta inmadura y el desarrollo en el campo y los daños en la fruta madura en la cosecha y durante el almacenamiento. La fruta afectada por el género *Colletotrichum* en postcosecha a menudo aparece completamente sana en el momento de la cosecha, un poco con síntomas de la enfermedad, sólo se manifiestan durante el almacenamiento. Esto es debido a la capacidad de muchas especies de *Colletotrichum* para causar infecciones latentes o quiescentes en el que el hongo infecta la fruta inmadura en el campo y luego se vuelve latente hasta que la fruta madura, en cuyo momento se reanuda su crecimiento causante de la enfermedad en la fruta (Wharton y Uribeondo, 2004).

C. acutatum pertenece a los ascomicetos. El patógeno se reproduce por conidios elipsoidales o fusiformes (tamaño $7-14 \times 2.5-3.5$ micras, con una pared celular delgada), que se disemina por el viento y el agua (fugas, el riego y la lluvia). La infección puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas ($18-33$ °C), humedad relativa alta (95-100%), la exposición a la humedad y la irrigación, el rocío o la lluvia durante 13 horas o más. El período de incubación es de sólo unos pocos días (Sindelková *et al.*, 2008).

Los conidios germinan para formar apresorios en superficie de las plantas, de las cuales la penetración de las hifas se desarrolla en las células vegetales. La infección puede ocurrir a través de casi cualquier superficie de la planta, pero para las especies herbáceas particularmente susceptibles, como la fresa y la anémona, la corona con su microclima relativamente húmedo es a menudo favorecida. En condiciones adecuadas, el hongo puede crecer rápidamente dentro de la planta y causar síntomas graves muy rápidamente, pero en otras circunstancias, el hongo puede ser quiescente dentro de los tejidos del huésped durante un período, en algunos casos sólo se hace aparente después de la cosecha. Una vez que el hongo ha desarrollado lo suficiente dentro de la planta, se producen cuerpos oscuros en los frutos, causando síntomas típicos de antracnosis. Los conidios se forman libremente, y normalmente se dispersan por salpique de agua (Yang *et al.*, 1992). Ellos pueden permanecer en estado latente en el suelo durante algún tiempo, a menudo de hibernación de esta manera.

La supervivencia es más larga en condiciones relativamente frías y secas (Eastburn y Gubler, 1992). El hongo también puede seguir siendo peligroso durante largos períodos en la materia vegetal muerta en la superficie o enterrados en el suelo.

La enfermedad en los cultivos tiende a ser más virulenta en los climas cálidos, donde el daño puede ser devastador, que con frecuencia tiene su origen en las condiciones más frías donde se cultiva el material de propagación. *C. acutatum* provoca también enfermedades de postcosecha en algunas frutas (Opgenorth *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1990; Sutton, 1992).

Esta especie se ha estudiado las últimas décadas; sin embargo, existen pocos estudios sobre aspectos clave de su biología. Esto es debido a que muchos aislamientos de *C. acutatum* se han identificado como *C. gloeosporioides*. En los últimos años el uso de técnicas de biología molecular ha posibilitado su distinción de entre otras especies (Wharton y Uribeondo, 2004).

2.4.8 *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz y Sacc. perteneciente a la familia Phyllachoraceae de la división Ascomycota, es un parásito facultativo asexual. El hongo comprende *C. gloeosporioides* como anamorfo estado imperfecto o asexual, *Glomerella cingulata* como estado sexual (perfecto) teleomorfo. *G. cingulata* ocurre sobre una amplia gama de especies hospederas produciendo acérvulos dentro del tejido del huésped durante la fase asexual (mitosis) de su ciclo de vida. El estado teleomorfo es conocido por su capacidad para causar una enfermedad grave *C. gloeosporioides* es definida como la especie predominante y principal patógeno de cultivos, es probablemente la más estudiada de todas las especies del género *Colletotrichum* en todo el mundo, ha sido relacionada por su amplio rango de hospederos (Bailey y Jeger, 2004) y es considerada como un grupo de especies

debido a que muestra un alto grado de variación morfológica, la capacidad que manifiesta este hongo para crecer y sobrevivir en un amplia variedad de temperatura explica en parte por qué produce enfermedades endémicas. El hongo puede mantener quiescencia pero ante condiciones favorables como heridas, condiciones atmosféricas y susceptibilidad del fruto, este ataca severamente, de tal manera que cualquier intento por rescatar los frutos es en vano (Santacruz y Morales, 2001). La etapa en la cual el hongo llega a ser quiescente puede ser al inicio de la germinación, elongación del tubo germinativo, formación de apresorios o colonización (Prusky y Plumbley, 1992).

El hongo prefiere un ambiente cálido y húmedo para la difusión de la enfermedad antracnosis uniforme y eficaz. El hongo invade principalmente en los tejidos lesionados o debilitado de plantas, produce diversas estructuras especializadas durante el proceso de infección. Estas estructuras especializadas como conidios, acérvulos, setas y apresorios que se forman durante la interacción entre el huésped y patógeno. Los conidios se pueden diseminar a través de distancias relativamente cortas por salpicaduras de lluvia o riego por aspersión e infectar otros tejidos vegetales saludables. La penetración en los tejidos del huésped generalmente se basa en la formación de estructuras de infección especializados conocidos como apresorios. Estos apresorios permiten que el hongo penetre la cutícula del hospedante (Kumar, 2014).

2.11 Antracnosis de los cítricos (*Colletotrichum* spp.)

La infección por *Colletotrichum* es la causa directa de enfermedades de las plantas; sin embargo, el hongo se presenta también como un saprofito o invasor secundario de tejidos en decadencia. Las pérdidas causadas por antracnosis ocurren principalmente como una reducción directa de la cantidad y calidad del producto cosechado. El hongo ataca frecuentemente más de una parte de la misma planta, lo que ocasiona enfermedades separadas que pueden interactuar durante el ciclo del cultivo (Waller, 1992). Los cítricos son un ejemplo donde varios órganos (brotes, hojas, flores y frutos) pueden ser infectados por la

enfermedad y en donde el inoculo de una fuente es capaz de infectar a otro (Garza y Medina, 1984; Orozco- Santos *et al.*, 2006).

La antracnosis es favorecida por la alta humedad y la lluvia. Es causada por especies de hongos del género *Colletotrichum*, siendo la más frecuente *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*; las cuales afectan también otras especies frutales que se cultivan en las mismas condiciones climáticas que las especies cítricas (Orozco-Santos y Timmer, 2005).

Las enfermedades causadas por *Colletotrichum* se presentan en un amplio rango de hospedantes distribuidos a nivel mundial, registrándose en precosecha y en postcosecha (Contreras, 2006)

2.11.1 Antracnosis en limón mexicano (ALM)

La antracnosis del limón mexicano afecta a esta especie citrícola y se presenta con mayor severidad durante el periodo de lluvias, temperaturas máximas de 31 °C y mínimas de 24 °C y con valores de humedad relativa superior al 90%. En condiciones del trópico seco, la lluvia es factor más importante que se relaciona con la incidencia y severidad de la enfermedad, sobre todo cuando ocurren precipitaciones de dos a cinco días consecutivos (Garza y Medina, 1984).

Los daños de antracnosis (muerte de tejidos) en árboles de limón mexicano se presentan principalmente durante la época de lluvias y su efecto en rendimiento está muy relacionado con la producción de los meses de invierno (diciembre-marzo) (Medina-Urrutia y Orozco-Santos, 1994; Orozco-Santos *et al.* 1999). En esta época, el precio de la fruta alcanza los valores más altos en el mercado. La enfermedad puede ocasionar pérdidas de 40 a 60% de la producción invernal en huertos sin control químico (Orozco- Santos *et al.* 1999).

2.11.2 Sintomatología de la enfermedad

La antracnosis de limón mexicano (ALM) afecta brotes, flores y frutos jóvenes, cuando la emergencia y desarrollo de estos coincide con periodos lluviosos, provocando que en las partes afectadas se observe una abundante esporulación con aspecto de polvillo color salmón, que corresponde a las masas conidiales del hongo. Los brotes afectados se pueden marchitar y eventualmente morir a partir de las puntas, en porciones que varían de uno a varios centímetros, dependiendo de la severidad (Orozco-Santos, 2006). En ataques fuertes, las hojas y brotes pueden ser dañados en su totalidad. Cuando esto ocurre, se observan brotes son síntomas de muerte descendente. Bajo condiciones de daño medio, en las hojas jóvenes aparecen deformaciones y zonas muertas en el borde o el ápice (Orozco-Santos, 2004).

Cuando la infección es poco severa o si las hojas se observan pequeñas lesiones cloróticas y deformación. Así mismo, en las hojas se observan pequeñas lesiones redondas de tamaño pequeño, las cuales con el tiempo se llegan a necrosar. Estas lesiones en las hojas, con el tiempo pueden caer produciendo un pequeño orificio ocasionando el síntoma típico de “tiro de munición”. Los racimos florales pueden ser dañados en su totalidad por la enfermedad (Medina *et al.* 2001; Garza y Medina, 1984; Orozco-Santos, 2004).

Los síntomas causados por *C. acutatum* son principalmente necrosis en varios tejidos del huésped tales como hojas, peciolo, flores, frutos, raíces o incluso una amplia variedad de hospedantes. Sin embargo, el patógeno no es un necrótrofo general, atacando solo el tejido joven o tejidos senescentes. Más bien este patógeno es altamente especializado como para cada tejido que ataca en cada hospedante. En algunos casos, un tejido juvenil puede ser atacado, mientras que otros tejidos son completamente inmunes a la infección. Por ejemplo, las flores de naranja dulce se ve muy afectado, pero no hay síntomas producidos en las hojas jóvenes. En las manzanas, la fruta se vea afectada, pero no se presentan síntomas en las hojas. El hongo es probablemente mejor considerado un hemibiotrófico en el sentido amplio, ya

que tiene fases biotróficas y necrotrófica dependiendo del anfitrión y el tejido en cualquier hospedante específico (Peres *et al.*, 2005).

Los tejidos jóvenes de limón mexicano son susceptibles y severamente atacados por *C. acutatum*. Sin embargo, en los cultivos de naranjas dulces y otros más, incluyendo limón persa, solo tejidos de las flores están infectados y desarrollan caída prematura de frutos; los tejidos vegetativos son inmunes (Peres *et al.*, 2005).

2.11.3 Epidemiología

El conocimiento del proceso de epidemiológico permite definir estrategias de manejo del patógeno mediante el diseño de modelos de predicción y el desarrollo de prácticas agrícolas apropiadas (Bergstrom y Nicholson, 1999).

La antracnosis de limón mexicano se presenta con mayor severidad durante el periodo de lluvias, temperaturas máximas de 31 °C y mínimas de 24 °C y con valores de humedad relativa superior al 90%. En condiciones del trópico seco, la lluvia es el factor más importante que se relaciona con la incidencia y severidad de la enfermedad, sobre todo cuando ocurren precipitaciones de dos a cinco días consecutivos (Garza y Medina, 1984; Medina *et al.*, 2001). Los conidios de *C. acutatum* son liberados solamente cuando el acérvulo o la masa de conidios está en contacto con el agua, ya que tanto las gotas de lluvia como del rocío los salpica y dispersa (Garza y Medina, 1984). También pueden ser diseminados por insectos o herramientas de cultivo; sin embargo, esta forma de dispersión tiene poca importancia en la epidemiología de la enfermedad. La infección del hongo se lleva a cabo mediante la penetración directa en hojas, brotes, frutos y flores, donde el micelio crece intercelularmente y produce colapso y muerte de los tejidos. Tiene un periodo de incubación muy corto; después de la infección, los primeros síntomas pueden observarse de 3 a 5 días. En las áreas

afectadas se pueden observar masas de conidios de color rosa. Los tejidos son más susceptibles cuando son jóvenes y la resistencia se incrementa con la edad. Las hojas llegan a ser inmunes al ataque por antracnosis de limón mexicano cuando completan su expansión. El fruto es susceptible a la infección por *C. acutatum* desde su formación hasta que alcanza un tamaño de 20 mm de diámetro (Timmer, 2000).

2.12 Fenología del fruto

La fenología se define, como el estudio de las relaciones entre las condiciones climáticas y fenómenos biológicos periódicos, como la floración de las plantas. En los cítricos se ha estudiado prioritariamente a la floración de naranjo dulce [(*Citrus sinensis* (L.))] y su evolución. Existen algunos estudios sobre especies de cítricos como son mandarina clementina (*Citrus clementina* Hort. Ex. Tan) y mandarina satsuma (*Citrus unshiu* Marc.), de los que se definen sus principales estadios de desarrollo. La falta de uniformidad entre ellos y con otras especies dificulta su generalización, la identificación de los distintos estadios y como consecuencia en su manejo (Agustí, 2004).

En cítricos la mayor parte de las especies, el fruto, tiene forma ovalada, es de color verde oscuro cuando está maduro, conforme se sobre madura la cáscara se torna ligeramente amarillenta, por dentro es de un verde claro, jugoso, ácido suave y posee semillas. Fruto pequeño, oval o esférico con base convexa y en ocasiones con cuello pequeño. Ápice convexo con mamila pequeña ligeramente hundida, cáscara delgada con superficie lisa coriácea y muy adherida, de color verde y verde amarillento al madurar: con 9 a 12 segmentos y un eje pequeño sólido, pulpa de color verde pálido, grano fino, muy jugosa, altamente ácida, con sabor y aroma distintivos; de 3 a 5 semillas, pequeñas y de color blanco. Los árboles fructifican todo el año, pero con mayor abundancia de mayo a octubre.

2.12.1 Caída de fruto pequeño (CFP)

La caída de fruto pequeño afecta principalmente las especies de cítricos como: naranja, toronja y limón Persa y se reportó por primera vez en Belice en el año de 1959 (Fagan, 1979) en México se detectó en 1968. Actualmente, ocurre en la mayoría de las zonas productoras, en el estado de Veracruz, Tamaulipas y Tabasco en la República Mexicana. Asimismo, se reporta en Florida, E.U.A. (McMillan y Timmer, 1989; Timmer *et al.*, 1994); Cuba, República Dominicana, Jamaica y Trinidad en el Caribe. La enfermedad se presenta en regiones citrícolas que registran lluvias durante los períodos de floración- fructificación. Considerando que los porcentajes de amarre de fruto para naranja navel son de 1.5 a 2.0% y para naranja valencia de 4 a 5%, las pérdidas ocasionadas por la enfermedad pueden llegar a más de 100 frutos por árbol. Durante 1993, en Florida fue un serio problema la caída de fruto pequeño. En algunas localidades se registraron pérdidas en rendimiento hasta de un 100% en naranja navel, mientras que en naranja valencia fueron de un 20 a 50% (Timmer y Zitko, 1993).

2.12.2 Síntomas de CFP

En los ataques fuertes aparecen los síntomas de la enfermedad en los pétalos de las flores cerradas todavía en los que se ven zonas como embebidas en agua (Denhan, 1988), pero usualmente no es hasta el estadio de flores abiertas en los que se manifiestan los primeros síntomas típicos de la enfermedad como manchas necróticas pardo-rojizas en los pétalos abiertos (McMillan y Timmer, 1988).

El síntoma característico de esta enfermedad es que al caer el fruto (CFP), tanto el pedúnculo como el receptáculo y cáliz permanecen adheridos a la rama (McMillan, 1993; Timmer *et al.*, 1994; Timmer, 2000). Estas estructuras se conocen como "tachuelas" en los estados citrícolas del Golfo de México. Las tachuelas están rodeadas por hojas levemente

distorsionadas y con nervaduras prominentes (Timmer *et al.*, 1994). Las tachuelas crecen más que lo normal y pueden permanecer adheridas a las ramas por un año o más y no afectan la intensidad de floración ni la producción de fruta de los años siguientes (Futch *et al.*, 1989). Las flores y frutos que se encuentran cerca de las flores afectadas también están propensas a caer antes del amarre de la fruta y formar tachuelas persistentes. Estudios recientes han demostrado la habilidad de *C. acutatum* para producir ácido indol acético y compuestos relacionados, lo cual puede contribuir parcialmente a incrementar los niveles de esta fitohormona en las flores de cítricos infectadas (Chung *et al.*, 2003). La abscisión del fruto ocasionada por la enfermedad ocurre en la base del ovario, lo que contrasta con la abscisión provocada por los procesos fisiológicos normales de árbol, la cual ocurre en la base del pedúnculo.

2.12.3 Epidemiología

La caída de fruto pequeño afecta a naranja dulce, limón persa y toronja y se presenta en regiones con lluvias durante el periodo de floración. El ciclo de la enfermedad ocurre cuando los conidios del hongo se producen de manera abundante en los acérvulos formados sobre los pétalos de flores infectadas durante la primavera. Estos conidios son lavados por las gotas de agua de lluvia o rocío y depositados en los tejidos vegetativos del árbol, en donde pueden germinar para formar apresorios o permanecer sin germinar y ocasionar infecciones latentes. En ausencia de floración, estos propágulos pierden viabilidad con el tiempo. Sin embargo, cuando se inicia la floración, los pétalos que caen sobre la superficie de las hojas proporcionan algunas sustancias que estimulan la germinación del apresorio para formar conidios, los cuales son diseminados hacia las flores nuevas por el salpique del agua de lluvia, reiniciando de esta manera el ciclo de la enfermedad. Su daño es más severo y puede manifestarse de manera epidémica cuando se presentan lluvias, o en periodos prolongados con alta humedad relativa y temperaturas bajas durante la floración y “amarre” del fruto (Agostini *et al.*, 1993).

El mínimo tiempo para la germinación de esporas y para que haya infección es de 12-18 horas y buenas condiciones de humedad el 90% de las flores presentaran los síntomas de la enfermedad luego de 2-3 días. Y a partir de ese momento la producción de esporas aumenta (Fagan, 1984).

La temperatura óptima para la germinación de esporas es de 23 °C y el tiempo mínimo para la infección y germinación es de 12 a 18 horas de modo que a partir de cuyo momento la enfermedad se propaga rápidamente. Si las condiciones húmedas prevalecen, alrededor del 90% de las flores pueden mostrar síntomas a los 3-4 días después de la infección (Fagan, 1984).

2.13 Técnicas moleculares

El ADN es una molécula que contiene el código genético, siendo sus propiedades el reflejo directo de la identidad genotípica y fenotípica de cada organismo, esta molécula es utilizada en la identificación de las especies debido a que está menos influenciada por los efectos ambientales. Un fragmento de ADN que representa variación genética (polimorfismo) debido a diferencias entre individuos en la longitud o secuencia de la doble cadena en un locus particular se denomina marcador molecular los mismos que son muy estables y útiles en la identificación de especies y poblaciones (Lewin, 2004). El uso de técnicas moleculares ha posibilitado la distinción entre especies del genero *Colletotrichum* spp. siendo esta una herramienta más confiable para construir la clasificación de este género. En los estudios del genero *Colletotrichum* spp. se ha concentrado en dos partes del genoma mitocondrial (ADNm) y ribosomal (ADNr), ambos presentes como múltiples copias en la célula (Rodríguez, 2007).

2.13.1 Técnicas moleculares que han permitido identificar a *Colletotrichum* spp.

Para estudiar la variabilidad genética en los organismos, se requiere del uso de caracteres o marcadores genéticos que sean fáciles de identificar y de seguir en la descendencia. Los

marcadores genéticos que se usan tradicionalmente, por lo general son insuficientes para caracterizar adecuadamente a los organismos; ahora con las técnicas moleculares se pueden estudiar los organismos a nivel del ADN (ácido desoxirribonucleico), lo que permite la separación y caracterización genética de los diferentes individuos de manera más precisa (Valverde y Paredes, 1996).

El uso de técnicas como los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP's), polimorfismos del ADN amplificados al azar (RAPD's), polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP's), o polimorfismos en la longitud de cromosomas (CLP), se han usado para establecer la variabilidad genética de muchos patógenos (Flores et al., 1997). Dentro de estas técnicas, una de las más usadas son los RAPD's, la cual es una variante del PCR, en donde se usa un solo iniciador (oligonucleótido corto de 9 a 10 nucleótidos) de secuencia arbitraria, el cual se une y amplifica secuencias al azar de varios y diferentes loci de un ADN molde (Waugh y Powell, 1992). Estos iniciadores detectan polimorfismos sin requerir del conocimiento de la secuencia de ADN (Campos, 1995).

Anteriormente *C. gloeosporioides* se atribuía a que provocaba las enfermedades de caída de fruto pequeño (colonias de lento crecimiento y color naranja) y antracnosis de limón mexicano, posteriormente Brown *et al.*, (1996) demostró con técnicas moleculares que ambas enfermedades corresponden a *Colletotrichum acutatum* Simmonds.

2.14 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). En cuanto a los marcadores moleculares para detectar la diversidad genética en *Colletotrichum* spp. se han utilizado cebadores arbitrarios y específicos. (Bridge *et al.* 1998).

La reciente llegada de nuevas técnicas moleculares para investigar directamente la variación en la molécula de ADN ha incrementado la precisión y resolución, facilitando el análisis. Estas técnicas moleculares han sido y continúan siendo desarrolladas para proveer marcadores moleculares adecuados para analizar diferentes niveles de variación genética entre poblaciones, dentro de poblaciones, y entre especies (Caterino *et al.* 2000).

El ADN ribosómico (ADNr) se ha utilizado como un marcador potencial para estudios filogenéticos. En el rRNA los genes se organizan en grupos de unidades repetidas en tándem, cada uno de los cuales consta de regiones codificantes (18S, 5.8S y 28S) y 2 espaciadores internos transcritos (ITS) y 1 no transcrito espaciador región (NTS). Mientras que las regiones codificantes están evolutivamente conservados y se han utilizado para las inferencias filogenéticas de los principales phylum (Hillis y Dixon, 1990), las 2 regiones ITS son adecuados para detectar diferencias entre los individuos específicos y son, por tanto, potencialmente marcadores útiles para el estudio de las relaciones de las poblaciones y especies estrechamente en hongos, vegetales y animales relacionado con taxones debido a sus tasas de evolución relativamente rápidos (Oliverio *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002).

Las diferencias entre los ITS de poblaciones y especies son expresadas como una filogenia, lo cual permite separar especies cercanamente relacionadas (Álvarez, 2000). Sin embargo, varios investigadores han demostrado que dentro de un mismo individuo existe variación en las secuencias de las diferentes copias del ITS. Esta variación puede resultar en la creación de filogenias erróneas si las variantes dentro de un individuo y entre individuos difieren tanto como las variantes entre poblaciones y especies (Harris y Crandall, 2000).

2.15 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una reacción enzimática en cadena que conlleva a la amplificación de secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico) específico de un ADN molde determinado, además se necesitan dos oligonucleótidos o iniciadores de 20 nucleótidos de longitud, cuya secuencia debe ser complementaria al ADN molde. La amplificación se realiza en presencia de dNTPs como sustrato y la reacción es catalizada por la Taq polimerasa.

La secuencia entre las dos regiones complementarias a los iniciadores es sintetizada al repetir los ciclos, los cuales consisten en una serie de temperaturas, donde el ADN es desnaturalizado, los iniciadores se alinean y se lleva a cabo la polimerización de la secuencia específica o amplicon (Rodríguez, 2007).

2.15.1 Electroforesis en Gel

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migraran hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo (Sambrook y Russell, 2001).

La electroforesis en gel es una técnica que se emplea para separar los ácidos nucleicos y las proteínas. La separación de las macromoléculas depende de dos variables: carga y masa. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae. La fuerza del material del gel actúa como “tamiz molecular”, separando las moléculas en función de su tamaño (Sambrook *et al.*, 1989).

2.15.2 Agarosa

La agarosa, coloide natural que se extrae de las algas, es un polisacárido lineal (con un peso molecular medio de ~12000 kDa) que gracias a su poder de polimerización y propiedades físico-químicas, lo han convertido en el soporte más común para electroforesis en el área de biología molecular. La agarosa es muy frágil y las manipulaciones pueden destruirla con facilidad. Los geles de agarosa poseen grandes “poros” y se emplean fundamentalmente para separar las moléculas grandes con un peso molecular de más de 200 kDa (Sambrook *et al.* 1989).

Los geles de agarosa permiten una electroforesis rápida, pero con una resolución limitada por cuanto las bandas que se forman en los geles tienen tendencia a ser difusas y a esparcirse. Ello obedece al tamaño de los poros y no puede controlarse. Los geles de agarosa se obtienen por suspensión de agarosa seca en apoyo en un tampón acuoso, tras lo cual se hace hervir la mezcla hasta que la agarosa se funde y se convierte en una solución transparente. A continuación, se vierte esta solución en un molde para gel y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta que se forma un gel rígido. Al endurecerse, la agarosa forma una matriz cuya densidad viene determinada por su concentración (Sambrook *et al.*, 1989).

2.15.3 Marcador ADN

La distancia de migración depende del peso molecular del material inicial en un gel de agarosa. Así pues, debe cargarse un marcador de ADN de tamaño conocido en las ranuras situadas en los extremos derecho e izquierdo del gel. Generalmente un marcador contiene un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo cual facilita la labor de determinar el tamaño de los ADN desconocidos en caso de que se produjese alguna distorsión sistemática del gel durante la electroforesis (Westermeier, 1997).

2.15.4 Tampón de carga

Las muestras de ADN que deben cargarse en el gel de agarosa se mezclan en primer lugar con un tampón de carga que por lo general contiene agua, sacarosa y un colorante (cianol de xileno, azul de bromofenol, Verde de bromocresol, etc.). La cantidad máxima de ADN que puede cargarse depende del número de fragmentos. La cantidad mínima de ADN que puede detectarse mediante fotografía de los geles teñidos con bromuro de etidio es de aproximadamente 2 ng en una banda .5 cm de ancho. Si una banda de este ancho contiene más de 500 ng de ADN, la ranura estará sobrecargada y se producirá emborronamiento (Westermeier, 1997). El tampón de carga se emplea con tres fines:

- Aumentar la densidad de las muestras para que las gotas de ADN caigan uniformemente en el pocillo.
- Añadir color a la muestra, simplificando este modo el proceso de carga.

- Incorporar un colorante a la muestra que, en un campo eléctrico, se desplace hacia el ánodo a una velocidad previsible.

3. MATERIALES Y METODOS

Las muestras obtenidas fueron recolectadas de las principales zonas productoras de México, como son el Golfo de México (Veracruz, Tabasco y Tamaulipas) y el Pacífico (Michoacán, Oaxaca y Colima) donde se obtuvieron un total de 48 aislamientos de diferentes zonas productoras (Cuadro 3) las colectas se realizaron en los periodos de febrero a marzo del 2013 donde inicia el periodo de floración para naranja valencia y limón persa, para limón mexicano fue en los periodos de julio a octubre del 2013 donde se ubica el periodo de lluvias.

Cuadro 3. Número de aislamientos, origen, parte vegetativa y la especie citrícola de donde se obtuvieron los aislamientos.

Aislamientos (No.)	Estado	Localidad	Tejido afectado	Especie citrícola
4	Veracruz	Martínez de la Torre	Flor	Limón persa
6	Veracruz	Martínez de la Torre	Flor	Naranja
6	Colima	Tecomán	Hoja	Limón mexicano
4	Michoacán	Apatzingán	Flor	Limón mexicano
4	Michoacán	Apatzingán	Hoja	Limón mexicano
4	Oaxaca	Villa de Etna	Hoja	Limón mexicano
4	Oaxaca	Villa de Etna	Flor	Limón mexicano
4	Oaxaca	Villa de Etna	Rama	Limón mexicano
4	Tabasco	Huimanguillo	Flor	Naranja
4	Tabasco	Huimanguillo	Flor	Limón mexicano
2	Tamaulipas	Cd. Victoria	Flor	Limón persa
2	Tamaulipas	Cd. Victoria	Flor	Naranja

3.1 Ubicación geográfica

En la figura 3 se presenta los estados donde se obtuvieron las muestras de cítricos, de las dos regiones de México



Figura 3. Estados donde se realizó el muestreo de las dos regiones cítricas

3.1.1 Recolección de muestras

La recolección de las muestras se obtuvieron de seis estados de la República Mexicana, de las principales zonas productoras del país, Tamaulipas, Veracruz y Tabasco (de la Costa del Golfo de México), Michoacán, Colima y Oaxaca (de la Costa del Pacífico).

En el estado de Veracruz, la recolección se realizó en el municipio de Martínez de la Torre, las coordenadas geográficas son de 20°04' latitud norte y 97° 04' longitud oeste, con una altitud de 151 msnm.

En el estado de Michoacán, las muestras se obtuvieron del municipio de Apatzingán, localizado entre los paralelos 19° 05' latitud norte y entre los meridianos 102° 21' longitud oeste. 300 msnm es la altitud a la que se localiza.

En Colima, se obtuvieron del municipio de Tecomán, ubicado en 18° 41' 20" y 19° 06' norte y 103° 59' y 103° 73' oeste, aproximadamente cuenta con una altitud de 30 msnm.

De Oaxaca, la recolección se realizó en el municipio de Villa de Etla, localizado en las coordenadas 96° 48' Oeste, 17° 12' Norte, tiene una altitud de 1660 msnm.

En el municipio de Huimanguillo, Tabasco, se realizó la colecta de las muestras, ubicado en 17° 40' 17" N, y 93° 25' 09" O tiene aproximadamente una altitud 1000 msnm

3.2 Recolección del patógeno

Se visitaron las huertas citrícolas, y se buscaron plantas con floración y brotación vegetativa que presentaran síntomas de antracnosis, se cortó la flor y el brote vegetativo con unas tijeras. Estas muestras fueron colocadas en bolsas de plástico previamente etiquetadas y refrigeradas para posteriormente transportarlas al laboratorio de postcosecha.

3.3 Fase de laboratorio

Los aislamientos del patógeno se realizaron en el laboratorio de enfermedades postcosecha, ubicado en el edificio de Fitosanidad dentro de las instalaciones del Colegio de Posgraduados (COLPOS), campus montecillos, ubicado en Texcoco, Edo. de México.

Las extracciones y amplificación de ADN se realizaron en el laboratorio de Bioquímica, ubicado en el COLPOS.

3.4 Aislamiento de *Colletotrichum* spp. del material vegetal

El procedimiento de aislamiento fue similar al método utilizado por Agostini *et al.* (1992).

Se preparó una solución de 1 L de medio de papa dextrosa agar (PDA), agregando 39 g/L⁻¹ de PDA y se esterilizó a una temperatura de 120 °C y 20 PSI de presión por 15 minutos.

Después de enfriar, dentro de la cámara de flujo el medio fue dispersado, colocando aproximadamente 20 mL por caja, en cajas Petri plásticas estériles y se dejó reposar en la cámara por cuatro horas a 28 °C. hasta que solidificó el medio.

El material vegetativo fue cortado y desinfectado con hipoclorito de sodio al 5% sumergiendo el material por un minuto para ser lavado por dos ocasiones con agua destilada estéril. Posteriormente, se colocó el material vegetal en un papel absorbente estéril para que se secan, el material se colocó dentro de las cajas Petri. Las cajas fueron incubadas por 5 días a una temperatura de 28°C.

Los aislamientos se mantuvieron a temperatura de 28°C, durante tres días, se realizó un procedimiento similar a Manandhar *et al.* (1995). Para obtener cultivos monospóricos, se tomó un poco de micelio y se agregó a un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad, con una micropipeta se agregó 1000 µL de agua destilada estéril, se agitó y el contenido del tubo se vació sobre una caja Petri con Agua Agar, se mezcló por toda la caja utilizando una varilla de vidrio estéril. Cada aislamiento fue incubado durante 24 horas a una temperatura de 28 °C. Las cajas se observaron en un microscopio estereoscópico encontrando un conidio individual germinado, se transfirió a una caja con medio PDA para su crecimiento y se mantuvo en incubación a 28 °C.

Los aislamientos puros se obtuvieron mediante resiembras en PDA de punta hifa, para la identificación del hongo, se analizaron las características de esporulación que reporta Orozco-Santos (2006) como el color de colonia, micelio y tipo de conidios.

Para conservar al patógeno, se utilizó medio PDA esterilizado y se colocó en tubos de ensaye aproximadamente 10 mL. se dejaron solidificar. Se obtuvo una rodaja de un aislamiento y se colocó dentro del tubo, se dejaron por 5 días y posteriormente se agregó glicerol estéril, para ser conservadas a temperatura ambiente.

3.5 Caracterización morfológica de *Colletotrichum* spp.

Para la caracterización morfológica y producción de inóculo se recomienda usar papa-dextrosa-agar como medio sólido (Orozco-Santos *et al.* 2004).

Una vez que se incubaron las cajas con el patógeno durante cinco días, se procedió a realizar la descripción, en una cámara de flujo, macroscópica cualitativa (color, forma, presencia o ausencia de anillos o halos concéntricos) y cuantitativa (tamaño) del conidio y el patógeno en una cámara de flujo laminar. Se realizó una medición de los diámetros de cada aislamiento durante 9 días midiendo cada 3er. día.

Para conocer la forma y el tamaño de los conidios de cada aislamiento, se utilizó una concentración de 5×10^5 conidios/mL, depositando una gota de 30 μ L en un portaobjeto de cristal cubriéndolo con un cubreobjetos. Se utilizó un microscopio óptico para tomar la fotografía, posteriormente, se utilizó el programa Dino Lite P/N: AM423X para realizar las medidas de los conidios.

3.6 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método del CTAB propuesto por Xiao *et al.* 2004.

Se precalienta el CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8.0; Na₂EDTA 2H₂O 20mM pH 8.0; CTAB 2%; NaCl 1.4 M; b-mercaptoetanol .2%), se raspó el micelio de la caja Petri y se pesa una cantidad de 100 mg de muestra de ADN, posteriormente se muelen las muestras utilizando nitrógeno líquido colocando las muestras dentro de un mortero y con un pistilo se molió hasta quedar polvo la muestra, adicionando 600 μ L de CTAB previamente calentado, fueron incubados los tubos a 60 ° C. por una hora, mezclándose por intervalos de 10 min. Utilizando un vortex Mistral Mixe. Adicionándosele a los tubos 800 μ L de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), por inversión se mezclaron, para centrifugarse y se tomó la fase acuosa (superior) para ser centrifugado a 12000 rpm, durante 10 min. Se toma la fase acuosa superior se colocó en un tubo nuevo, donde se le adicionó 600 μ L de isopropanol frío,

mezclándose por inversión al menos siete veces. Se incubó por una hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, posteriormente se centrifugó a 8500 rpm por 8 min. Luego se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol durante dos veces, se centrifugó a 14000 rpm durante 8 min. Eliminando el sobrenadante, para que la pastilla se seque a temperatura ambiente por 30 min. Luego de ese tiempo se disolvió la pastilla en 300 μL de TE. Para observar la calidad de ADN se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.7 Cuantificación de ADN de *Colletotrichum* spp.

Una vez obtenido el material genético, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Se debe considerar el factor de dilución para obtener en nanogramos/microlitro ($\text{ng}/\mu\text{L}$).

Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores indican la presencia de proteínas.

Para conocer la cantidad y calidad del ADN se necesitaron tubos eppendorf de 3 mL, en cada tubo se colocó 100 μL de muestra, agregándose 2900 μL de agua destilada estéril, se agitaron por inmersión, se pasaron a medir en el espectrofotómetro.

3.8 Electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa se preparó al .8% (p/v), disolviéndola en solución amortiguadora TAE 1x (1 g de agarosa + 100 mL de sol. amortiguadora), esta solución amortiguadora TAE 1x se obtiene de una solución de TAE 12.5x (60.5 g Tris Base, 25 mL de EDTA 0.5 M pH8, 14.2 mL. de ácido acético glacial), se disuelven todos los reactivos en 800 mL de agua destilada estéril y se afora a 1 L). La solución se disolvió en solución amortiguadora calentándola en un horno de microondas. La agarosa se colocó dentro de la cámara de electroforesis para correr el gel, con un peine incorporado para realizar los pocillos, y se retiró el peine después

de la polimerización. Se añadió solución amortiguadora de electroforesis TAE 1x, para que cubriera totalmente el gel de agarosa. Posteriormente, se aplicó la muestra preparada y el marcador de peso molecular en cada uno de los pocillos, el volumen de la muestra fue de 10 μ L y 5 μ L de amortiguador de carga 5X Green GoTaq (PROMEGA), se mezclaron y se cargaron en una cámara horizontal de electroforesis. Los electrodos se conectaron a la fuente de alimentación MP-2000P, el tiempo varió de 50 a 60 min aproximadamente dependiendo de las muestras cargadas. Finalmente el gel fue colocado en un recipiente y teñido en una solución de 80 mL de agua y 8 μ L de Bromuro de Etidio dejando el gel aproximadamente 20 min., la banda se visualizó en el transluminador (Infinity 1000/26MX) mediante luz ultravioleta y se tomó la imagen para observarla y los resultados obtenidos.

3.9 Amplificación del ADN mediante PCR

Para la amplificación se utilizó un volumen de reacción de 22 μ L con la siguiente concentración final: agua ultra pura estéril 13.7 μ L, solución amortiguadora 1X, 2 μ L; MgCl₂ a 1.5 mM, 1 μ L; dNTPs a 2mM, 2 μ L; iniciadores ITS4 a 265 μ Mol, Cglnt a 161 μ Mol, calnt2 a 202 μ Mol, 1.1 por iniciador; Taq ADN polimerasa, 0.1 μ L, por muestra, y ADN 1 μ L.

Para la PCR se utilizó un termociclador Biometra Tpersonal con el siguiente programa, para *C. gloeosporioides*,: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min; alineamiento a 60 °C por 2 min, extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 5 min. (Barquero *et al.* 2013).

Para *C. acutatum* se usó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min; alineamiento a 59 °C por 2 min, extensión a 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min. (Zivkovic *et al.* 2010).

El producto de PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa (1%), posteriormente, se colocó y se tiñó en una solución de 80 mL de agua y 8 μ L de bromuro de etidio por 20 min., y la banda se visualizó en un transluminador (Infinity 1000/26MX) se tomó una fotografía, observando el tamaño de las bandas.

4. RESULTADOS

4.1 Muestreo de *Colletotrichum* spp.

Los aislamientos fueron obtenidos de síntomas de diferentes tejidos de los arboles (Figura 4); en flor, con un total de 30 aislamientos. De los cuales para naranja valencia (NV) fueron 12, para limón mexicano (LM) 12 y para limón persa (LP) 6. En rama se realizaron 4 aislamientos de LM. En hoja los aislamientos fueron 14, correspondiendo todos a LM. Los aislamientos fueron recolectados de la Costa del Pacífico (Colima, Michoacán, Oaxaca) y del Golfo de México (Tabasco, Veracruz y Tamaulipas).



Figura 4. Síntomas de antracnosis en tejidos. **A.** Síntomas de antracnosis en brotes de limón mexicano, **B.** Síntomas de antracnosis en flor limón persa

4.2 Caracterización morfológica de *Colletotrichum* spp.

Se obtuvieron 48 aislamientos de *Colletotrichum* spp. asociados a la antracnosis de cítricos. Los resultados se presentan en el Cuadro 4.

De los aislamientos de *Colletotrichum* spp colectados en las dos regiones (Golfo y Pacifico) citrícolas de México se identificaron a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* en los diferentes hospedantes, en el Cuadro 4 se presentan las características morfológicas de las colonias desarrolladas en medio de cultivo Papa-Dextrosa-agar (PDA) de los aislamientos obtenidos.

Cuadro 4. Características de las colonias de *Colletotrichum* spp. obtenidas de tejidos de limón mexicano, limón persa y naranja valencia.

Especie (hospedante)/aislamiento	Características de las colonias
Antracnosis en limón persa <i>C. acutatum</i> AVERLPP1, AVERLPP5, , AVERLPP10,	La colonia es de color naranja ligero, en la parte central, donde se encuentra la masa conidial, en el envés se presenta un color naranja a café. Presenta un micelio ligeramente algodonoso, en forma circular de color blanco a naranja.
Antracnosis en limón persa <i>C. gloeosporioides</i> GVERLPP6, GVERLPP9, GVERLPP11, GTAMLPP49, GTAMLPP50	La colonia es color naranja con anillos concéntricos y la parte posterior es de color gris. Se observan masas conidiales en el centro de la colonia. El micelio es abundante y algodonoso de color gris a blanco de rápido crecimiento.
Antracnosis en naranja valencia <i>C. acutatum</i> AVERNPF2, AVERNPF4, AVERNPF7, AVERNPF8, ATABNPF38, ATABNPF39, ATABNPF40, ATAMNPF45, ATAMNPF46, ATAMNH48	El aspecto de la colonia es de color naranja, en forma circular, presenta en el centro anillos concéntricos, la parte posterior es de color café. Tiene un micelio poco algodonoso y compacto.
Antracnosis en limón mexicano <i>C. acutatum</i> ACOLLMH14, ACOLLMH15, ACOLLMH16, ACOLLMH17, AMICLMH22, AMICLMH23,	Presenta, la colonia, un color naranja ligero con un anillo concéntrico que se presenta por las masas conidiales de color naranja a salmón, su parte posterior, también presenta un color

AMICLMH25, AOAXLMH28, ATABLMF43, ATABLMF44	naranja en el centro. Tiene un micelio algodonoso de color blanco a gris, con un anillo pronunciado.
Antracnosis en limón mexicano <i>C. gloeosporioides</i> GMICLMF18, GMICLMF19, GMICLMF20, GMICLMF21, GMICLMH24, GOAXLMH26, GOAXLMH27, GOAXLMT29, GOAXLMF30, GOAXLMF31, GOAXLMF32, GOAXLMF33, GOAXLMT34, GOAXLMT35, GOAXLMT36, GTABLMF41, GTABLMF42	El patógeno es de rápido crecimiento presenta un micelio abundante aéreo y algodonoso de color gris a blanco, se observa en el centro de la colonia abundante masa conidial, de color gris a naranja con anillos concéntricos, por la parte posterior es de color gris oscuro.

Los aislados se obtuvieron a partir de lesiones de antracnosis de diferentes tejidos de flor, hoja y rama de limón mexicano, naranja valencia y limón persa. La morfología de las colonias fue variable y la variabilidad dependió de los hospederos. Los aislamientos de *C. acutatum* de naranja valencia, limón mexicano y limón persa fueron caracterizados por medio del color de la colonia, distribución de acérvulos, en toda la colonia.

Los aislamientos de *C. gloeosporioides* colectados en limón mexicano de los diferentes tejidos en los estados de Colima, Michoacán, Oaxaca, Tabasco, presentaron características similares en el medio de cultivo PDA (Figura. 5A).

En Limón persa *C. gloeosporioides* aislado de flor presenta en el centro de la colonia una masa conidial, de color naranja con anillo concéntrico, en la parte posterior es de color gris oscuro. El micelio es abundante y algodonoso de color gris a blanco de rápido crecimiento (Figura. 5B).

C. acutatum aislado de naranja valencia en flor de Veracruz, Tamaulipas y Tabasco, tiene una colonia de color naranja, en forma circular, presenta en el centro anillos concéntricos, la parte posterior es de color café. Tiene un micelio poco algodónoso y compacto (Figura. 5C).



Figura 5. Morfología de colonias sembradas después de tres días. **A.** *C. gloeosporioides* aislado de limón mexicano en flor, **B.** *C. gloeosporioides* aislado de limón persa en flor, **C.** *C. acutatum* aislado de naranja valencia en flor.

4.2.1 Medición de colonias

Se midió el crecimiento de las colonias con un vernier en intervalos de 3, 6 y 9 días de los diferentes aislados de *Colletotrichum* spp. (Figuras. 6, 7 y 8) colectados de varios cítricos y de las regiones observadas (Cuadro 4). Los aislamientos que presentaron mayor crecimiento fueron todos los aislados de *C. gloeosporioides* a los 3, 6 y 9 días después de la siembra. A los 9 días presentó un promedio de crecimiento de 22.3 cm². Los aislados de *C. acutatum* presentaron un menor crecimiento en naranja valencia, limón persa y limón mexicano, a los 9 días de su crecimiento presentó un promedio de 16.3 a 16.8 cm² (Cuadro 5).



Figura. 6. Medición de las colonias de *Colletotrichum acutatum* aislado de flor naranja valencia en el estado de Veracruz a los 3, 6 y 9 días de crecimiento



Figura. 7. Medición de las colonias en los días 3, 6 y 9 días, que fueron utilizadas para su medición, *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de flor en limón persa, en el estado de Tamaulipas.



Figura. 8. Medición de las colonias en los días 3, 6 y 9 días, que fueron utilizadas para su medición, *Colletotrichum acutatum* aislado hoja en limón mexicano, en el estado de Colima.

Cuadro 4. Crecimiento en medio de cultivo papa-dextrosa-agar de *Colletotrichum* spp. colectados en cítricos de las diferentes regiones en México.

Aislamiento	Patógeno	Hospedante	Días de crecimiento (cm) ²		
			34	6	9
AVERLPF1	<i>C. acutatum</i>	Limón persa	4.4	11	17.1
AVERLPF5	<i>C. acutatum</i>	Limón persa	4.9	11.4	17.5
AVERLPF10	<i>C. acutatum</i>	Limón persa	4.2	10.6	16.5
AVERNPF2	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4.1	10.3	16.3
AVERNPF4	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4	10.8	16.9
AVERNPF7	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4.1	10	16.1
AVERNPF8	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	3.9	10.2	16.3
ATABNPF38	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4	10	16.2
ATABNPF39	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4.3	10.5	16.4
ATABNPF40	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4.1	10.6	16.7
ATAMNPF45	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4.5	10.8	16.6
ATAMNPF46	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4.3	10.7	16.3
ATAMNPF48	<i>C. acutatum</i>	Naranja valencia	4.1	10.6	16.2
ACOLLMH14	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	4.3	10.6	16.5
ACOLLMH15	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	4.1	10.4	16.7
ACOLLMH16	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	3.9	10.1	16
ACOLLMH17	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	4	10	16.1
AMICLMH22	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	4.2	10.3	16.2
AMICLMH23	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	4.5	10.6	16.5
AMICLMH25	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	4.2	10.3	16.4
AOAXLMH28	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	4.3	10.6	16.5
ATABLMF43	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	4.3	10.8	16.6
ATABLMF44	<i>C. acutatum</i>	Limón mexicano	5.5	10.4	16.4
GVERLPF6	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón persa	5.6	14.2	22.4
GVERLPF9	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón persa	5.2	14	22.2
GVERLPF11	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón persa	4.9	13.5	21.9
GTAMLPF49	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón persa	6.1	14.8	22.9
GTAMLPF50	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón persa	5.9	14.5	22.4
GMICLMF18	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.6	14.1	22.3
GMICLMF19	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	4.9	13.6	22
GMICLMF20	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.1	14	22.2
GMICLMF21	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.4	13.9	22
GMICLMH24	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.2	13.8	21.9

GOAXLMH26	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	6.2	14.8	22.9
GOAXLMH27	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.9	14.4	22.6
GOAXLMT29	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	6.1	14.8	22.8
GOAXLMF30	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.6	14.2	22.5
GOAXLMF31	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.6	14.2	22.4
GOAXLMF32	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.1	14	22.1
GOAXLMF33	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.4	14	22.1
GOAXLMT34	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	6	14.7	22.6
GOAXLMT35	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5	13.9	22
GOAXLMT36	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.3	14.1	22.4
GTABLMF41	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	6.2	14.9	22.9
GTABLMF42	<i>C. gloeosporioides</i>	Limón mexicano	5.3	14.1	22.3

Crecimiento a partir de una rodaja de la colonia y desarrollado en papa-dextrosa agar

Cuadro 5. Comparación de medias de las colonias de *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* en crecimiento en medio de cultivo PDA, en un intervalo de 3, 6 y 9 días de crecimiento.

Región Golfo			
Especie	Día 3	Día 6	Día 9
<i>C. Gloeosporioides</i>	5.5700 A	14.2800 A	22.4300 A
<i>C. Acutatum</i>	4.2000 B	10.4900 B	16.3900 B
	Pr>F: <.0001	Pr>F: <.0001	Pr>F: <.0001
Región Pacifico			
<i>C. Gloeosporioides</i>	5.3200 A	13.4800 A	21.220 A
<i>C. Acutatum</i>	4.1800 B	10.3800 B	16.400 B
	Pr>F: 0.0121	Pr>F: 0.0054	Pr>F: 0.0043

Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey Pr>F0.05).

4.2.2 Medición de conidios

Los conidios de los patógenos observados fueron diferente, siendo los de *C. acutatum* más pequeños que de *C. gloeosporioides*, presentando en los aislamientos que son hialinos, con un extremo redondo y otro fusiforme con un tamaño de 8-16 x 4-6 μ . en las dos regiones (Golfo y Pacífico) y en los diferentes tejidos (Cuadro 6).

Los conidios de *C. gloeosporioides* tienen ambos extremos redondeados teniendo un tamaño de 10-20 x 5-7 μ . más grandes que los de *C. acutatum* independientemente de la región y de los tejidos estudiados (Figura. 9).



Figura 9. A. conidios de *C. gloeosporioides* presentes en hoja de limón mexicano de Oaxaca.
B. Conidios de *C. acutatum* obtenidos de flor de naranja aislado de Veracruz.

Cuadro 6. Tamaño y forma de conidios Se presenta el tamaño promedio de conidios (μ) de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* su hospedante y las muestras resultantes.

Muestras	Hospedante	Medición de <i>C. acutatum</i> Largo x ancho (μ)	Varianza	Forma de conidio de <i>C. acutatum</i>
AVERLPF1, AVERLPF5, , AVERLPF10,	Lima Persa	9-15 x 4.2-5.6	0.48	Hialino, con un extremo redondeado y el otro fusiforme
AVERNf2, AVERNf4, AVERNf7, AVERNf8, ATABNF38, ATABNF39, ATABNF40, ATAMNF45, ATAMNF46, ATAMNH47, ATAMNH48	Naranja	8-15.6 x 4.1-6	0.11	Hialino, con un extremo redondeado y el otro fusiforme
ACOLLMH14, ACOLLMH15, ACOLLMH16, ACOLLMH17, AMICLMH22, AMICLMH23, AMICLMH25, AOAXLMH28, ATABLMF43, ATABLMF44	Limón Mexicano	8.5-16 x 4.5-5.7	1.2	Hialino, con un extremo redondeado y el otro fusiforme
Muestras	Hospedante	Medición de <i>C. gloeosporioides</i> Largo x ancho (μ)	Varianza	Forma de conidio de <i>C. gloeosporioides</i>
GVERLPF6, GVERLPF9, GVERLPF11, GTAMLPF49, GTAMLPF50	Lima Persa	10.5-19.5 x 5.2-6.7	1.06	Ambos extremos redondeados
GMICLMF18, GMICLMF19, GMICLMF20, GMICLMF21, GMICLMH24, GOAXLMH26, GOAXLMH27, GOAXLMT29, GOAXLMF30, GOAXLMF31, GOAXLMF32, GOAXLMF33, GOAXLMT34, GOAXLMT35, GOAXLMT36, GTABLMF41, GTABLMF42	Limón Mexicano	10.2-19.7 x 5.3-6.7	0.19	Ambos extremos redondeados

4.3 Caracterización molecular

4.3.1 Extracción de ADN genómico de *Colletotrichum* spp.

Al comenzar los análisis moleculares en los hongos aislados a partir de las diferentes partes vegetativas de cítricos, se extrajo ADN a partir de micelio. Utilizando el protocolo Xiao, *et al.*, (2004). El ADN fue resuspendido en 200 μ L de TE. Las concentraciones de ADN obtenidas en las extracciones estuvieron entre los 40 y 200 ng/ μ L, cantidad necesaria para la realización de la PCR, esta técnica permite la amplificación del ADN a partir de cantidades de 0.1 ng (Lee y Taylor, 1990).

4.3.2 Amplificación de las muestras

Para la amplificación del ADN, mediante PCR, se utilizó el kit de la UNAM helicasa siguiendo paso a paso el protocolo del kit. Se usaron iniciadores específicos para las especies, para *C. acutatum* (Cgalnt2) combinado con el primer universal ITS4 y para *C. gloeosporioides* (Cglnt) combinado con el primer universal ITS4 (Figura 10, 11).

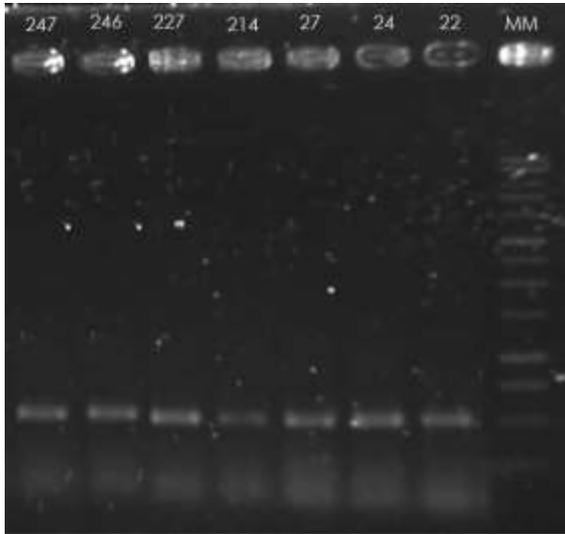


Figura. 10. Amplificación de PCR específica para la identificación de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de los tejidos vegetativos, observando las bandas de las amplificaciones de las muestras *C. acutatum* aislado de Flor en naranja valencia en el Edo. de Veracruz.

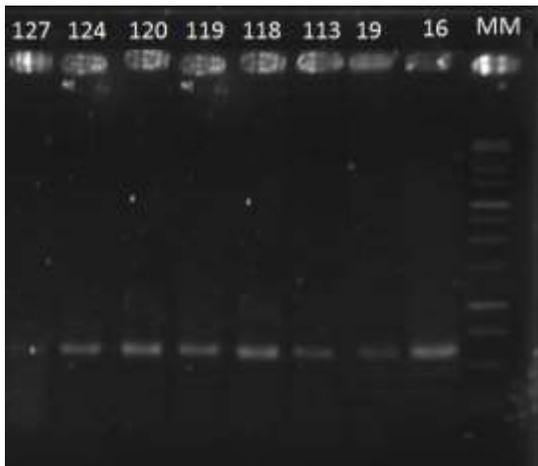


Figura. 11. Amplificación de PCR específica para la identificación de *Colletotrichum* spp. Obtenido de los tejidos vegetativos, observando las bandas de las amplificaciones de las muestras *C. gloeosporioides* aislado de Flor en Oaxaca en limón mexicano.

El producto de PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa (1%) teñido con bromuro de etidio se visualizó en un transluminador (Infinity 1000/26MX) se tomó una fotografía, observando el tamaño de las bandas y el patógeno amplificado (Cuadro7).

Cuadro 7. Amplificación de *Colletotrichum*. Se muestran el número de aislamientos amplificados por estado la especie citrícola obtenida y el patógeno que fue amplificado

Núm. de Aislamientos	Estado	Especie citrícola	Parte vegetativa	Patógeno amplificado
4	Veracruz	N	Flor	<i>C. acutatum</i>
3	Veracruz	LP	Flor	<i>C. acutatum</i>
3	Veracruz	LP	Flor	<i>C. gloeosporioides</i>
5	Colima	LM	Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>
1	Colima	LM	Hoja	<i>C. acutatum</i>
4	Michoacán	LM	Flor	<i>C. gloeosporioides</i>
3	Michoacán	LM	Hoja	<i>C. acutatum</i>
1	Michoacán	LM	Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>
3	Oaxaca	LM	Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>
1	Oaxaca	LM	Hoja	<i>C. acutatum</i>
4	Oaxaca	LM	Flor	<i>C. gloeosporioides</i>
4	Oaxaca	LM	Rama	<i>C. gloeosporioides</i>
1	Tabasco	N	Flor	<i>C. gloeosporioides</i>
3	Tabasco	N	Flor	<i>C. acutatum</i>
3	Tabasco	LM	Flor	<i>C. gloeosporioides</i>
1	Tabasco	LM	Flor	<i>C. acutatum</i>
2	Tamaulipas	N	Flor	<i>C. acutatum</i>
1	Tamaulipas	N	Hoja	<i>C. gloeosporioides</i>
1	Tamaulipas	N	Hoja	<i>C. acutatum</i>

LM: Limón mexicano, LP: Lima Persa, N: Naranja

5. DISCUSION

Las características morfológicas en medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar) y moleculares con ITS e iniciadores específicos, permitieron identificar a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en naranja valencia, limón persa y limón mexicano en las región del Golfo y el Pacífico.

C. acutatum y *C. gloeosporioides* presentan una complejidad taxonómica, debido a que ambos tienen una gran gama de hospedantes. En el trabajo realizado por Agostini *et al.*, (1992) se indicaron tres cepas diferentes de *C. gloeosporioides* que se ubicaban en los cítricos. La primera cepa era un saprófito, de crecimiento rápido de color gris (FGG) por sus siglas en inglés “Fast growing gray” y no era responsable de la CFP, este es el agente causal de antracnosis en postcosecha (Timmer *et al.*, 1998). La segunda cepa causa antracnosis en hojas inmaduras, frutos y flores de limón mexicano. La tercera cepa, se ha reportado como el agente causal de la CFP en todos los cítricos (Timmer *et al.*, 1998), es una forma especializada de *C. gloeosporioides* (Fagan, 1979) y está referido por Agostini *et al.*, (1992) y Sonoda Pelosi (1988) como una cepa de lento crecimiento y de color naranja (SGO) por sus siglas en inglés “Slow Growing Orange”, produciendo mayormente micelio blanco con masas conidiales naranjas. Según Brown *et al.*, (1996), la segunda y tercer cepa son consideradas como *C. acutatum*. Se detectaron aislamientos correspondientes a *Colletotrichum gloeosporioides* y a su teleomorfo *Glomerella cingulata*. Las cepas de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* son muy similares y ha sido difícil separarlos por una metodología tradicional taxonómica.

En cuanto a la morfología de los conidios se ha reportado que *C. acutatum* en PDA son hialinos con un extremo redondeado y otro fusiforme (Wharton y Uribeondo, 2004), con un tamaño de 8-16 x 5-4 μ (Sutton, 1992, Gunnel y Gubler, 1992). Mientras que para *C. gloeosporioides* sus conidios presenta ambos extremos redondeados (Orozco-Santos *et al.*, 2008), teniendo un tamaño de 10-20 x 5-7 μ . (Kumar, 2014; Orozco, 2006).

La velocidad de crecimiento fue otro criterio de clasificación, un experimento similar realizado por Orozco-Santos *et al.*, (2004) con una cepa de *C. acutatum* aislado de limón mexicano, se demostró que es de lento crecimiento comparado con *C. gloeosporioides*. En el trabajo realizado por Timmer *et al.*, (1992) se reportó que la velocidad de *C. gloeosporioides* es 2 o 3 veces más rápida que la de *C. acutatum*. Las pruebas moleculares son más precisas para clasificar los hongos (Brown *et al.*, 1996).

Las colonias de *C. gloeosporioides* aislado de las especies cítricas estudiadas presentó abundante micelio aéreo, algodonoso, de color gris a gris oscuro. Características similares reportadas por Orozco-Santos (2006), Timmer *et al.*, (1998), Agostini *et al.*, (1992). Sus características son comunes y coinciden con aislamientos colectados en diferentes hospedantes y partes del mundo (Ford *et al.*, 2004). En las colonias de *C. acutatum* de limón mexicano, limón persa y naranja valencia se observó poco micelio menos algodonoso y aéreo que *C. gloeosporioides*, teniendo un color blanco a naranja (Orozco-Santos 2006).

Por su heterogeneidad genotípica y fenotípica *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* son consideradas especies que tienen diversas poblaciones, este último comportándose como saprofito afectando a los cítricos en México. *C. acutatum* siendo el agente causal de antracnosis en limón mexicano y caída de fruto pequeño (Brown *et al.*, 1996; Bailey y Jeger, 1992; Peres *et al.*, 2005; Orozco-Santos, 2006). El uso de la técnica molecular y características morfológicas permitió diferenciar a *C. acutatum* de *C. gloeosporioides* (Orozco-Santos, 2006).

El análisis mediante marcadores ITS combinado con iniciadores específicos para *Colletotrichum*, permitió identificar y diferenciar a *C. acutatum*; sobre sus hospedantes naranja valencia y limón persa en flor, en limón mexicano en hoja. Y *C. gloeosporioides* en limón mexicano en hoja, y también en algunos aislados de flor en naranja valencia y limón persa comportándose como saprofito (Jeffries *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1996). Se observó un polimorfismo entre estas especies. Presentándose un patrón de bandas diferente entre ellos

(Xiao *et al.*, 2004; Denoyes-Rothan *et al.*, 2003). Esta técnica ha sido de mucha utilidad para identificar y separar las diferentes especies (Zivkovic *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2012; Sanabria *et al.*, 2010; Barquero *et al.*, 2013;).

6. CONCLUSIONES

La técnica molecular ITS, combinado con los iniciadores específicos, permitió constatar la presencia de *C. acutatum* en naranja valencia y limón persa en flor en la región del Golfo (Veracruz, Tamaulipas, Tabasco), y en limón mexicano en hoja en la región del Pacífico (Colima, Michoacán, Oaxaca). Así mismo, se encontró a *C. gloeosporioides* en limón mexicano en hoja, también encontrándose en algunos aislados de flor en naranja valencia y limón persa, comportándose como saprofito en los tejidos obtenidos en las dos regiones estudiadas. Tanto la identificación morfológica como la molecular permitieron distinguir dos especies de *Colletotrichum* spp. Los patógenos *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* se encontraron en la región del Golfo y Pacífico, en las tres especies cítricas y los tejidos obtenidos.

Existe variabilidad morfológica entre; *C. acutatum*: que produjo colonias de color blanco a gris de lento crecimiento, forma redondeada, poco micelio, tiene conidios con un lado fusiforme y otro redondeado en limón mexicano, limón persa y naranja valencia. Y *C. gloeosporioides* demostró colonias de color naranja y de rápido crecimiento con micelio abundante algodonoso, con conidios de ambos lados redondeados.

La antracnosis de limón mexicano es causada por *C. acutatum* se encuentra distribuida en la región del Pacífico, la caída de fruto pequeño en naranja valencia y limón persa es causada por *C. acutatum* se encuentra en la región del Golfo de México, así como *C. gloeosporioides* que se comporta como saprofito en las regiones cítricas de la República mexicana.

7. LITERATURA CITADA

- Adaskaveg, J. E., Correl, J.C., Peres, N.A., Timmer, L.W. 2005. Life styles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease. 89 (8):784-796.
- Agostini, J.P., and Timmer, L.W. 1992. Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Plant disease 76:1176-1178.
- Agostini, J.P., Timmer, L.W., and Mitchell, D.J. 1993. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Phytopathology 82:1377-1382
- Agrios, G. N. 1995. Clasificación de hongos fitopatógenos. Fitopatología. 2a. Edición. México: Limusa S.A. de C.V. 837p.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology, 5th edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.
- Agustí, M. 2004. Fruticultura. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 493 pp.
- Alarcón. M. Rocha-Peña. M. Ovando-Cruz. E. Primer Simposio Nacional de Capacitación Citrícola en el Estado de Oaxaca. Memoria. 2000
- Allende-Molar, R., García, R. S., y Carrillo, A. 2003. Enfermedades post-cosecha en mangos cultivados en Sinaloa.
- Albrigo, L; y Devices, F; 1999. Cítricos. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.

- Álvarez, J. 2000. Use of molecular tools for discriminating between two populations of the citrus leafminer parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). Ph.D. dissertation. Gainesville, FL, US, Department of Entomology and Nematology, University of Florida. 90 p
- Amortegui, F. I., Capera, D. E., Godoy, A. J., 2001. El cultivo de los cítricos, modulo educativo para el desarrollo tecnológico de la comunidad rural. Edición. Colombia EL POIRA, S.A. 35 p.
- Ariza, F. R., Alia, T. I., Nicolás, B. M., Ambriz, C. R., Lugo A. A., Barrios, A. A., Barbosa, M. F. 2010. Calidad de los frutos de Naranja “Valencia” en Morelos, México. *Revista iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, México. 11:2 pp.148-153.
- Bailey, J., O’Connell R., Pring R., y Nash C. 1992. Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. In: Bailey J.A.; Jerger M.J. (Ed). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB Internacional., pp 88-98, 107-109.
- Bailey, J. y Jeger, M. 1992 *Colletotrichum* biology, Pathology and control. Red Wood Press London, England p 388.
- Bailey, J. y Jeger, M.J. 2004. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Brithis Society for Plant Pathology. C. A. B. International. 388 p.
- Bailey, J., O’Connell, R. J., Pring, R. J., and Nash, C. 2004. Infection, Strategies of *Colletotrichum*. In Bailey, A. J. and Jerger, j. M. 1992. *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. Brithis Society for Plant Pathology. C. A. B. Internacional 88-120 pp.
- Barnett, H. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Cuarta edición. The American Phytopathological Society. Pp. 188-189.

- Barquero, Q.M., Peres, A.N., Arauz, L.F., 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense* 37(1): 23-38.
- Benítez-Camilo, F.A., Huerta-Palacios, G., Holguín-Meléndez, F., y Toledo-Arreola, J. 2003. Efecto de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en la caída de frutos de mango cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:223-227.
- Bergstrom, G. y Nicholson, R. 1999. The biology of corn anthracnose. Knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease* 83: 596-608.
- Bridge. P., Couteaudier, Y. y Clarkson, J.M. 1998. Molecular Variability of fungal pathogens. CABI International. Wallingford, United Kingdom. 319 p.
- Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S., and Timmer, L.W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 30:391-418.
- Bryson, R.J., Caten, C.E., Hollomon, D.W., and Bailey, J.A. 1992. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.). p. 27-46. CAB International. Wallingford, U.K.
- Campos, H.A. 1995. Marcadores moleculares. Conceptos. Notas técnicas. *AGRO SUR* 23:63-75.
- Caterino, M.; Cho, S.; Sperling, F. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45:1-54.

- Chen C., Wallace C., Wolstenholme J. 2002. Analysis of mitochondrial 12S RNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals. *Molecular. Phylogenetic. Evolution.* 23: 137-149
- Chung, K.-R., Shilts, T., Ertürk, Ü. Timmer, L.W., and Ueng, P.P. 2003. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum*, causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiology Letters* 226:223-30
- Contreras, C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos de frutos de Lulo (*Solanum quitoense*), Tomate de árbol (*Solanum Betacea*), granadilla (*Passiflora ligularis*), Mango (*Mangifera indica*) y tallos de Mora (*Rubus glaucus*) con síntomas de antracnosis. Bogotá Colombia. En línea <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis239.pdf> consultado el 12 de septiembre del 2013
- Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria (COVECA). Monografía de la Naranja. 2011. Gobierno del estado de Veracruz.
- Correa, G., Lavalett, L., Galindo, M., Afanador L. 2007. Uso de métodos multivariantes para la agrupación de aislamientos de *Colletotrichum* spp. con base en características morfológicas y culturales. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 60 (1):3671-3690.
- Denham, T. 1988. Post bloom fruit drop disease. In: *Compendium of citrus diseases*, edited by Whiteside, S. Garnsey y Timmer, L. APS Press, ST, Paul, pags 24-25.

- Denoyes-Rothan, B., Guérin, G., Délye, C., Smith, B., Minz, D., Maymon, M., y Freeman, S. 2003. Genetic diversity and pathogenic variability among isolate of *Colletotrichum* species from strawberry. *Phytopathology* 93:219-228.
- Dillard, H.R. 1987. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. In: Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds) *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. P. 225-236. CAB International. Wallingford, U.K.
- Dodd, J.C., Estrada, A., Jeffries, P., Bugante, R. y Jegger M. 1989. The use of epidemiological studies of *Colletotrichum gloeosporioides* to assess the effectiveness of pre and post harverst application of fungicides in control of Mango anthracnose. Filipinas.
- Dodd, J.C., Estrada, A., and Jeger, M.J. 1992. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics. In: Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds) *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. P. 308-325. CAB International. Wallingford, U.K.
- Eastburn, D.M.; Gubler, W.D. (1992) Effects of soil moisture and temperature on the survival of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 76, 841-842.
- Espinosa, S. 1992. El mercado de limón persa en México. Centro de Investigaciones Económicas Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM)-Universidad Autónoma Chapingo (UACH), 154 p.
- Fagan, H.J. 1979. Postbloom fruit drop, a new disease associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annals of Applied Biology* 91:13-20.
- Fagan, H.J. 1984. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: I. Disease epide Turrialba 34(2):179-186.

- Femania, R. 2007. Caracterización química de cepas de hongos del género de *Colletotrichum*: Síntesis de Gloeosporiol. Diseño y síntesis de modelos agentes fungicidas. Tesis de Doctorado en ciencias. Universidad de Cádiz. Puerto Real. 346p.
- Flores, O.A., Martínez, S.J.P. y Martínez, E.A.D. 1997. Uso de nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. *Fitopatología* 32:96-111.
- Freeman S y E Shabi. 1996. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiol. Mol. Plant Pathology*. 49:395-404.
- Freeman, S., Katan, T., and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-605.
- Freeman, S., Minz, D., Maymon, M., Zveibil, A., 2001. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology* 91:586-592.
- Ford, R., Banniza, S., Photita, W., and Taylor, P.W. 2004. Morphological and molecular discrimination of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose on lentil in Canada. *Australian Plant Pathology* 33:559-569.
- Futch, S.H., Herb, J.W., and Sonoda, R.M. 1989. Effect of removal of persistent calyxes from navel orange trees affected by postbloom fruit drop. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 102:4-5.
- Garza, L.J.G. y Medina-U., V.M. 1984. Diseases of Mexican lime *Citrus aurantifolia* [(Christm) Swingle] in Mexico. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1:311-315.

- Gómez, C., Schwentesius R. y Barrera G. 1994. El limón persa en México. Una opción para el trópico. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). Centro de Investigaciones Económicas y Sociales y Tecnológicas Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México, 142 p.
- Gunnell, P., Gubler, W. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry Mycology 84:154-165.
- Harris, D.; Crandall, K. 2000. Intragenomic variation with in ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies. Molecular Biology. Evolution. 17, 284-291.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 2004. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. 1ra. Reimpresión. UNAM. Fondo de Cultura Económica. Mexico D.F. 551 p.
- Hillis D., Dixon M. 1991. Ribosomal ADN: molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biological. 66: 411-453
- Howard, C., M., J., L., Mass, C., K., Chandler, E., E., Albrechts. 1992. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. Plant Disease 76:976-981.
- Jeffries, P., Dodd, J., Jeger, M., and Plumbley, R. 1990. The biology of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology. 39:343-366
- Jones y Slabaugh. 1994. Effect of foliar infection caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russet Burbank potato. pp 11. In: Patogenicidad, Variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en México. Tesis de Doctorado para obtener el grado en Biotecnología Microbiana, Facultad de ciencias Biológicas y Agropecuarias, Colima. 105p.

- Kranz, J.; Schmutterer, H. y Koch, W. 1982. Berlín, Verlag Enfermedades, plagas y malezas de los cultivos tropicales. Enfermedades bacterianas. 154p.
- Kumar, A.G. 2014. *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenecity and management in India. J Plant Physiol Pathol, 2:2. doi:10.4172/2329-955X.1000125
- Lee, S., Taylor, J. 1990. Isolation of ADN from fungal mycelia and singles spores. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press. San Diego. USA. 482 p.
- Lenné, J. M. 1992. *Colletotrichum* diseases of legumes. In: Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds) *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. P. 134-166. CAB International. Wallingford U.K.
- Lewin. B. 2004. Genes VIII. Eighth Edition. Pearson Prentice Hall. New York. USA. 1027
- Mabberley DJ. 1997. A classification for edible Citrus (Rutaceae). Telopea 7: 167-172.
- Manandhar, J.B, Hartman, G.L., Wang T.C. 1995. Conidial germination and appresorial formation of *Colletotrichum capsici* y *C. gloeosporioides* isolates from pepper. Plant Disease 79:361-366.
- Mass, J. 1983. Anthracnose of strawberry fruit in Mayland. Plant Disease Reporter. 62:488-492.
- McMillanm, R.T y Timmer L. W. 1988. Post bloom fruit drop in south Florida. The Citrus Industry, pags. 15, 17-18.

- McMillan, R.T. y Timmer L. W. 1989. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Florida. *Plant Disease* 73:81.
- McMillan, R.T., Jr. 1993. An update on the incidence of post bloom fruit drops on 'Tahiti' limes in south Florida. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 106:108-110.
- Medina-Urrutia, V. M. y Orozco-Santos, M. 1994. Situación actual sobre el control de antracnosis (*Gloeosporium limetticolum*) del limón Mexicano. Memoria de la VII Reunión Trópico 94. Universidad de Colima. p. 19-21.
- Medina, U., Robles G., S. Becerra R., J. Orozco R., M. Orozco S., J. G. Garza L., M. E. Ovando C., X. Chávez C. F. A. Félix C. 2001. El cultivo del limón mexicano. SAGARPA-INIFAP. Libro Técnico Núm. 1. México. 188 p.
- Mendgen, K. and Hahn, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci.* Aug; 7(8): 352-356.
- National Center for Biotechnology Information. (NCBI). En línea, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Consulta: 23 de Julio, 2014).
- Nicholson, R.L. 1992. *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose diseases of maize and sorghum. In: *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds). P. 186-202. CAB International. Wallingford U.K.
- O'Connell, R., Perfect, S., Hughues, B., Carzaniga, R., Bailey, J., y Green, J. 2000. Dissecting the cell Biology of *Colletotrichum* Infection processe. In: *Colletotrichum* host specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction. The American Phytopathologica Society. St. Paul mn. 57-77. pp.

- O'Neill, N., van Berkum, P., Lin, J., Kuo, J., Kernworthy, W. y Saunders, J. 1997. Application of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism for Genetic Characterization of *Colletotrichum* pathogens of Alfalfa. *Phytopathology* Vol. 87, No. 7. 745-750
- Oliverio M, Cervelli M., Mariottini P. 2002. ITS2 rRNA evolution and its congruence with the phylogeny of muricid neogastropods (Caenogastropoda, Muricoidea). *Molecular Phylogenetic Evolution*. 25: 63-69.
- Opgenorth, D.; White, J.; Gunnell, P. 1989. Strawberry anthracnose. *California Plant Pest and Disease Report* 8, 114-116.
- Orozco-Santos, M., Manzo-Sánchez, G., Guzman-González, S., y Salmón-Veles, G. 1999. Crecimiento de *Colletotrichum acutatum*, causante de la antracnosis del limón mexicano en diferentes medios de cultivo. *Memorias del XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Guadalajara, Jalisco, México. (Resumen No. 60).
- Orozco-Santos, M. 2001. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo. Primera Reimpresión. México. 150 p.
- Orozco-Santos, M., Manzo-Sánchez, G., Guzman-Gonzalez, S., Farías-Larios, J., y Timmer, L. W. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. *Revista de fitopatología* 22:423-428.
- Orozco-Santos, M. y Timmer, L. 2005. Antracnosis del limón mexicano: situación actual y manejo integrado en el trópico seco de México. En *Memorias del V Congreso Argentino de Citricultura 2005*. Concordia, Entre Ríos, Argentina. p. 27.

- Orozco-Santos, M. 2006. Patogenicidad, Variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en México. Tesis de Doctorado para obtener el grado en Biotecnología Microbiana, Facultad de ciencias Biológicas y Agropecuarias, Colima. Universidad de Colima. 105p.
- Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V.M., Robles González, M.M., Orozco Romero, J., Pérez-Zamora, O., Velásquez-Monreal, J.J., Timmer, L.W. y Salvador Guzmán-González. 2006. Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. Folleto técnico No. 2. 72 p.
- Peres N. A., Timmer L. W., Adaskaveg J. E., Correll J. C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. The American Phytopathological Society. Plant Disease 89:8 784-796.
- Prusky, D., and Plumbley, R., A. 1992. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits: *Colletotrichum*: Biology, Pathology, and Control. Wallingford. CAB International. 289-307 pp.
- Rodríguez, A. 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. Asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. Consultado el 20 de mayo del 2014. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis18.pdf>
- Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A., Gómez, L. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banana (*Musa* spp.) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas postcosecha. Agronomía Costarricense. 36 (1): 53-68.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, capítulo 6.
- Sambrook, K. J. y Russell D. de W. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*. Volumen III 3 ed. New York. 2400 pp.
- Sanabria, A., Mahuku, G., Kelemu, S., Cadavid, M., García, C., Hío, J., Martínez, E., Osorio, J. 2010. Molecular identification and characterization of *Colletotrichum* spp. Isolates from Tahiti lime, tamarillo and mango. *Agronomía Colombiana*, vol. 28:3 pp. 391-399.
- Santacruz, U. H. y Morales, G. J. L. 2001. La antracnosis, varicella, sarampión, marchitez y muerte descendente en aguacate (*Persea Americana* Mill.) CV. Hass, causada por el hongo (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) (*Glomerella cingulata* (Ston) Schr. Y Spauld); su impacto económico y manejo integrado. 1er. Congreso Mexicano y Latinoamericano del aguacate. Uruapan, Michoacán. México. 321-323 pp.
- Schiller, M., Lubeck, M., Sundelin, T., Campos, L.F., Danielsen, S., Jensen, D.F., Madriz, K. 2006. Two subpopulations of *Colletotrichum acutatum* are responsible for anthracnose in strawberry and leatherleaf fern in Costa Rica. *European journal of Plant Pathology* 116:107-118.
- Schwentesius, R., Gómez, M. 2005. *Limón Persa: Tendencias en el Mercado*. Universidad Autónoma Chapingo. PIAI-CIESTAAM. 150 p
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. *Producción Agrícola anual*. Consultado el 16 de Febrero 2015.
- SIACON. 2006. *Estadísticas de producción de productos agropecuarios de México*.

- Sindelkova, M., Vahala, O., Juroch J. 2008: Virulence of *Colletotrichum acutatum* isolates to several host plant. Acta universitatis Agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis. 59:3 151-170 pp.
- Sitterly, W.R., and Keinath, A.P. 1996. Anthracnose. In: Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds) *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. P. 24-25. CAB International. Wallingford, U.K.
- Sonoda, R.M., Pelosi, R.R. 1998. Characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. Proc Fla State Hortic Soc 101:36-38
- Sreenivasaprasad, S., Talhinhas, P. 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a Cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. Molecular Plant Pathology 6:361-378.
- Sreenivasaprasad, S., Sharada K., Brown A.E., Mills P.R. 1996. PCR based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathology 45:650-655
- Sutton, B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum biology, epidemiology and control*, CAB International, Wallingford, UK. pp. 1-26.
- Svetlana Z., Stojanovic S., Trkulja N., Dolovac N., Aleksic G. y Balaz J. 2010. Morphological and Molecular Identification of *Colletotrichum acutatum* from Tomato Fruit. Pestic Phytomed (Belgrade), 25 (3), 231-239
- Timmer, L.W. y Zitko, S.E. 1992. Timing of fungicide applications for control of postbloom fruit drop of citrus in Florida. Plant Disease 76:820-823.

- Timmer, L.W. y Zitko, S.E. 1993. Use of environmental factors and inoculum levels to predict postbloom fruit drop incidence. *Citrus Industry* 74:4, 5, 7.
- Timmer, L.W., Agostini, J.P., Zitko, S.E., and Zulficar, M. 1994. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease* 78:329-334.
- Timmer, L. W., Brown, G. E., and Zitko, S. E. 1998. The role of *Colletotrichum spp.* in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. *Plant Disease* 82:415-418.
- Timmer, L. W. 2000. Lime anthracnose. In: *Compendium of citrus diseases*. Second edition. L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and J.H. Graham (Eds.). p. 22-23. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Timmer, L. W., Mondal, S. N., Peres N. A. R., Bhatia A. 2004. Fungal diseases of fruit and foliage of citrus trees. *Diseases of Fruits and Vegetables I*: 191-227.
- Valverde, M.E., y Paredes, L.O. 1996. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad el caso de los hongos. *Ciencia y Desarrollo* 22:29-37
- Waller, J.M. 1992. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: .Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds) *Colletotrichum: Biology, pathology and control* p.167-185. CAB International. Wallingford, U.K.
- Waugh, R., and Powell, W. 1992. Using RAPD's markers for crop improvement. *Tibtech* 10:186-191.
- Westermeier, R. (1997). *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of ADN and Protein Separation*, VCH, Weinheim.

- Wharton, S. y Uribeondo, D. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del jardín botánico de Madrid 6(1): 3-22 pp.
- Wilson, L.; Madden, L.; Ellis, M. 1990. Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. Phytopathology 80, 111-116
- Xiao, C. L., MacKenzie, S. J., and Legard D. E., 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* from strawberry and non-cultivated hosts. Phytopathology 94:446-553.
- Yang, X.; Madden, L.; Reichard, D.; Wilson, L.; Ellis, M. 1992. Splash dispersal of *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora cactorum* from strawberry fruit by single drop impactions. Phytopathology 82, 332-340.
- Zivkovic, S., Stojanovic, S., Ivanovic, Z., Trkulja, N., Dolovac, N., Aleksic, G. and Balaz, J., 2010. Morphological and Molecular Identification of *Colletotrichum acutatum* from Tomato Fruit. Pestic. Phytomed 25:3, 231-239.