



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

***Colletotrichum spp. CAUSANTES DE
ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE AGUACATE EN
MÉXICO: FILOGENIA, MORFOLOGÍA,
DISTRIBUCIÓN, PATOGENICIDAD Y
SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS***

DIONICIO FUENTES ARAGÓN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXOCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2020

La presente tesis titulada: ***Colletotricum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate en México: filogenia, morfología, distribución, patogenicidad y sensibilidad a fungicidas**, realizada por el alumno: **Dionicio Fuentes Aragón**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. DANIEL TÉLIZ ORTÍZ

ASESORA


DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR


DR. JOSÉ ANTONIO MORA AGUILERA

ASESOR


DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

ASESOR


DR. NESTOR BAUTISTA MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2022

***Colletotrichum* spp. CAUSANTES DE ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE
AGUACATE EN MÉXICO: FILOGENIA, MORFOLOGÍA, DISTRIBUCIÓN,
PATOGENICIDAD Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS**

Dionicio Fuentes Aragón, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2020

RESUMEN

Colletotrichum es uno de los géneros de hongos más importantes en el mundo, debido a su gran diversidad genética, amplio rango de hospedantes y distribución. En México, *Colletotrichum* causa antracnosis en frutos de aguacate, mermando la calidad y producción. La aplicación de fungicidas autorizados es una estrategia implementada en el manejo integrado de esta enfermedad. Sin embargo, se desconoce la diversidad de especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en aguacate, así como la sensibilidad/resistencia a fungicidas. El objetivo de esta investigación fue identificar, caracterizar y proponer opciones de control químico, a través de filogenia, morfología, distribución, patogenicidad y sensibilidad a fungicidas, de las especies causantes de antracnosis en frutos de aguacate cv. Hass, en las principales regiones productoras de México. Se aislaron 232 cepas de *Colletotrichum*, las cuales se agruparon con base en características culturales y morfológicas. Un subgrupo de 104 cepas se seleccionó y analizó con base en la amplificación y secuenciación del gen que codifica al gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa. Posteriormente, se seleccionaron diferentes haplotipos de acuerdo a al origen para su identificación mediante el análisis filogenético multilocus. Se identificaron 11 especies ocasionado antracnosis en aguacate, de las cuales, dos fueron reportadas previamente en México (*C. karsti* y *C. godetiae*), tres son nuevos reportes en el país (*C. siamense*, *C. fioriniae*, y *C. cigarro*), cuatro nuevos reportes en el mundo asociados al aguacate (*C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. nymphaeae*, y *C. tropicale*) y dos nuevos linajes (*Colletotrichum* sp. 1 y 2). Todas las especies fueron sensibles a tiabendazol, con valores de $CE_{50} < 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ y $CE_{95} < 2 \text{ mg L}^{-1}$, mientras que siete especies (*C. siamense*, *C. chrysophilum*, *C. tropicale*, *C. jiangxiense*, *C. karsti*, *C. fioriniae* y *C. nymphaeae*) fueron resistentes a azoxistrobin, con valores de $CE_{50} > 1000 \text{ mg L}^{-1}$. Estos resultados permitirán implementar mejores estrategias de manejo de la antracnosis en aguacate.

Palabras clave: Complejos de especies de *Colletotrichum*, identificación, nuevos reportes de *Colletotrichum*, resistencia

***Colletotrichum* spp. CAUSAL AGENTS OF AVOCADO FRUIT ANTHRACNOSE
IN MEXICO: PHYLOGENY, MORPHOLOGY, DISTRIBUTION,
PATHOGENICITY, AND FUNGICIDES SENSITIVITY**

Dionicio Fuentes Aragón, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2020

ABSTRACT

Colletotrichum is one of the most important fungi genus in the world due to high genetic diversity, wide host range and distribution. In Mexico, *Colletotrichum* causes anthracnose on avocado fruit, diminishing quality and production. Spraying of authorized fungicides is a strategy implemented in the integrated management of the disease. Nevertheless, the *Colletotrichum* species diversity causing avocado anthracnose is unclear, as far as the sensitivity/resistance to fungicides. This study aimed to identified, characterize and propose management chemical options, through phylogeny, morphology, distribution, pathogenicity and fungicide sensitivity, the *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit cv. Hass, obtained from the main producer regions in Mexico. A total of 232 isolates were obtained, which were grouped based on cultural and morphological characteristics. A subset of 104 isolates was selected and analyzed by amplification and sequencing of gene coding gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Haplotypes from several origin were selected for multilocus identification. Eleven species were identified causing antracnose on avocado, which two were previously reported in Mexico (*C. karsti* y *C. godetiae*), three novel reports in Mexico (*C. siamense*, *C. fioriniae*, and *C. cigarro*), four new records associated with avocado in the world (*C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. nymphaeae*, and *C. tropicale*), and two novel lineages (*Colletotrichum* sp. 1 y 2). All species were sensitivity to thiabendazol with values of $CE_{50}<0.4 \text{ mg L}^{-1}$ y $CE_{95}<2 \text{ mg L}^{-1}$, while seven species (*C. siamense*, *C. chrysophilum*, *C. tropicale*, *C. jiangxiense*, *C. karsti*, *C. fioriniae* y *C. nymphaeae*) were resistant to azoxystrobin with values of $CE_{50}>1000 \text{ mg L}^{-1}$. These results will enable to implement best management strategies of avocado anthracnose.

Keywords: *Colletotrichum* species complexes, identification, new reports of *Colletotrichum*, resistance.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

Al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) por el financiamiento parcial para la presente investigación.

Al Colegio de Postgraduados por las instalaciones y comodidades proporcionadas.

Al Dr. Daniel Téliz Ortíz, por dirigirme a través del posgrado con confianza, actitud y amplios conocimientos.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por la confianza en mis habilidades e inmenso apoyo en este trabajo de investigación.

Al Dr. José Antonio Mora Aguilera, por el valioso apoyo en el proyecto y acertadas sugerencias para mejorar este trabajo.

Al Dr. Sergio Aranda Ocampo, por las importantes observaciones para mejorar la presente investigación.

Al Dr. Nestor Bautista Martínez, por las acertadas observaciones y visión amplia de la presente investigación.

Al PhD. Vladimiro Guarnaccia, por la gran amabilidad y accesibilidad al aportar los conocimientos para mejorar la presente investigación.

Al M. C. Jorge Manuel Valdez Carrasco, por la provechosa asesoría en la medición de estructuras fúngicas.

Al Dr. Cristian Nava Díaz y Dr. Sergio Ayvar Serna por participar como sinodal interno y externo, respectivamente. Sus observaciones contribuyeron a mejorar este documento.

A todos los profesores de Fitopatología por aportar valiosos conocimientos durante mi formación académica.

A todos los integrantes de la Coordinación de Fitopatología por apoyarme en todas las dudas y trámites que tuve durante mi estancia.

A los productores de aguacate, especialmente al Sr. Gabriel, quien nos dio accesibilidad a sus huertos y conocimientos adquiridos a través de los años.

A Marco Magallanes Tapia, Fabián y Ever Jerónimo Martínez por apoyarme en el muestreo de frutos de aguacate.

A mis amigos y compañeros que conocí durante mi estancia: Manuel Aguirre Rayo, Petra Aguirre Rayo, Fortino Aguirre Rayo, Uriel Acosta González, Candelario Ortega Acosta, José Terrones Salgado, Samuel Tetla Solano y Eduardo Godinez.

DEDICATORIA

A: Sandra Berenice Juárez Vázquez y Alan Misael Fuentes Juárez, son lo mejor de mi vida, el motivo de luchar día a día con todo el entusiasmo.

A mis padres: Teresa Aragón Pacheco y Plácido Fuentes Saavedra, por darme la vida y guiarme a través de ella.

A mis hermanos: Rubicel y Margarita, por su apoyo incondicional de siempre.

“La vida se refleja en un juego de ajedrez, dónde valiosas piezas han partido, junto al Rey, al ajedrez eterno”, en memoria de una gran persona Miguel Méndez Fuentes, por haberme enseñado el arte del ajedrez.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVOS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
LITERATURA CITADA.....	21

CAPÍTULO I. ESPECIES DEL GÉNERO *Colletotrichum* ASOCIADAS

A LA ANTRACNOSIS DEL AGUACATE EN MÉXICO

1.1 RESUMEN.....	33
1.2 ABSTRACT.....	34
1.3 INTRODUCCIÓN.....	35
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1.4.1 Muestreo y aislamiento.....	37
1.4.2 Extracción de DNA, PCR y secuenciación.....	38
1.4.3 Diversidad de haplotipos.....	39
1.4.4 Análisis filogenético multilocus.....	40
1.4.5 Reconocimiento de especies a través de la Concordancia Genealógica Filogenética.....	41
1.4.6 Caracterización morfológica y cultural.....	53
1.4.7 Pruebas de patogenicidad.....	53
1.4.8 Análisis estadístico.....	54
1.5 RESULTADOS.....	54

1.5.1 Diversidad genética a través de la red de haplotipos.....	54
1.5.2 Análisis filogenético multilocus.....	56
1.5.3 Caracterización morfológica y cultural.....	63
1.5.4 Prevalencia y distribución de <i>Colletotrichum</i> spp.	69
1.5.5 Pruebas de patogenicidad.....	71
1.6 DISCUSIÓN.....	73
1.7 LITERATURA CITADA.....	79

**CAPÍTULO II. SENSIBILIDAD *in vitro* A TIABENDAZOL Y
AZOXISTROBIN DE CEPAS DE *Colletotrichum* spp. CAUSANTES DE
ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE AGUACATE**

2.1 RESUMEN.....	84
2.2 ABSTRACT.....	85
2.3 INTRODUCCIÓN.....	86
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
2.4.1 Aislamientos.....	87
2.4.2 Sensibilidad <i>in vitro</i> a fungicidas sobre el crecimiento micelial.....	88
2.4.3 Análisis estadístico.....	89
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	89
2.6 LITERATURA CITADA.....	102
CONCLUSIONES GENERALES.....	107

LISTA DE CUADROS

REVISIÓN DE LITERATURA	Página
Cuadro 1. Comparación de las tres razas de <i>Persea americana</i>	5
CAPÍTULO I.	
Cuadro 1. Oligos utilizados en este estudio para la amplificación y secuenciación de regiones génicas.....	39
Cuadro 2. Cepas de los complejos de <i>Colletotrichum</i> usadas en la reconstrucción filogenética con datos del hospedante, origen y números de accesión de GenBank.....	42
Cuadro 3. Parámetros de las particiones de los análisis filogenéticos, mediante Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana, para cada complejo de especies de <i>Colletotrichum</i>	57
Cuadro 4. Modelos evolutivos seleccionados con MrModelTest para los complejos de especies (CE) del género <i>Colletotrichum</i> , e incluidos en el análisis Bayesiano para la reconstrucción filogenética.....	58
Cuadro 5. Características morfológicas determinadas en medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y Spezieller Nahrstofffarmer agar (SNA), y tasa de crecimiento de 11 especies de <i>Colletotrichum</i> causantes de antracnosis en frutos de aguacate en México.....	65
CAPÍTULO II.	
Cuadro 1. Concentraciones efectivas (CE), modelos de ajuste para el cálculo de CE y parámetros de selección de los modelos para determinar la sensibilidad a tiabendazol en especies de <i>Colletotrichum</i> causantes de antracnosis en frutos de aguacate.....	92
Cuadro 2. CE50 y CE95 de las especies de <i>Colletotrichum</i> sensibles a azoxistrobin, incluyendo el mejor modelo de ajuste y parámetros de selección.....	100

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I.

Figura 1. Red de haplotipos construida con 104 secuencias parciales del gen <i>gapdh</i> , correspondiente a aislamientos obtenidos de frutos con síntomas de antracnosis en México. El tamaño del círculo representa el número de secuencias que se agruparon en el mismo haplotipo. Los guiones representan las sustituciones entre haplotipos relacionados. La red se construyó en POPART usando el algoritmo de Templeton, Crandall y Sing (TCS).....	55
Figura 2. Árbol filogenético Bayesiano correspondiente a 14 cepas del complejo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> reconstruido con secuencias parciales concatenadas de la región ITS y los genes <i>gapdh</i> , <i>chs-1</i> , <i>act</i> , <i>tub2</i> , <i>gs</i> , y <i>ApMat</i> . Las cepas colectadas en este estudio se representan en rojo. La escala representa sustituciones por sitio. Las probabilidades posteriores y soporte bootstrap se representan en los nodos (PP/SB). <i>Colletotrichum boninense</i> cepa CBS 123755 se usó como fuera de grupo.....	59
Figura 3. Árbol filogenético Bayesiano correspondiente a seis cepas del complejo <i>Colletotrichum boninense</i> reconstruido con secuencias concatenadas de la región ITS y los genes parciales <i>gapdh</i> , <i>chs-1</i> , <i>act</i> , <i>tub2</i> y <i>his3</i> . Las cepas colectadas en este estudio se muestran en rojo. La escala indica sustituciones por sitio. Los valores de probabilidad posterior y soporte bootstrap se muestran en los nodos. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> cepa CBS 112999 se usó como fuera de grupo.....	60
Figura 4. Árbol filogenético Bayesiano correspondiente a ocho cepas del complejo <i>Colletotrichum acutatum</i> reconstruido con secuencias parciales concatenadas de la región ITS y los genes parciales <i>gapdh</i> , <i>chs-1</i> , <i>act</i> , <i>tub2</i> , and <i>his3</i> . Las cepas colectadas en este estudio se muestran en rojo. La escala indica sustituciones por sitio. Los valores de las probabilidades posteriores y soportes bootstrap se muestran en los nodos. <i>Colletotrichum boninense</i> cepa CBS 123755 se usó como fuera de grupo.....	61
Figura 5. Árbol filogenético Bayesiano correspondiente a tres cepas del complejo <i>Colletotrichum magnum</i> reconstruido con secuencias parciales	

concatenadas de la región ITS y los genes parciales <i>gapdh</i> , <i>chs-1</i> , <i>act</i> , <i>tub2</i> y <i>his3</i> . Las cepas colectadas en este estudio se muestran en rojo. La escala indica sustituciones por sitio. Los valores de las probabilidades posteriores y soportes bootstrap se muestran en los nodos. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> cepa CBS 112999 se usó como fuera de grupo.....	62
Figura 6. Resultados de las pruebas de índice de homoplasia de los nuevos linajes <i>Colletotrichum</i> sp. 1 (CPO 27.818, CPO 27.800) y <i>Colletotrichum</i> sp. 2 (CPO 27.832, CPO 27.999, CPO 27.1003) con los clados más cercanos. Un valor de $\phi_w < 0.05$ indica recombinación genética.....	63
Figura 7. Características culturales y morfológicas de 11 especies de <i>Colletotrichum</i> causantes de antracnosis en frutos de aguacate en México. En orden de izquierda a derecha, vista frontal de la colonia en papa dextrosa agar (PDA) a los 10 días, vista del reverso en PDA, conidios o ascosporas en PDA, conidios en Spezieller Nahrstofffarmer agar (SNA), y apresorios. Escala en todas las figuras = 10 μm	67
Figura 8. Características de la fase sexual de <i>Colletotrichum jiangxiense</i> cepa CPO 27.850 en medio papa dextrosa agar. Peritecios (a-c), ascas conteniendo ascosporas (d-j), ascosporas (k, l). Escala en a-e = 20 μm y en f-l = 10 μm	68
Figura 9. Prevalencia de especies de <i>Colletotrichum</i> y su correspondiente complejo de especies, aisladas de frutos de aguacate con antracnosis en México ($n = 232$).....	69
Figura 10. Mapa de distribución de 11 especies de <i>Colletotrichum</i> causantes de antracnosis en frutos de aguacate en seis regiones productoras de México ($n = 232$).....	70
Figura 11. Pruebas de patogenicidad de 11 especies de <i>Colletotrichum</i> evaluados a los 7 días después de la inoculación. (a) Síntomas de antracnosis en cv. Hass; (b) Análisis de varianza y prueba de medias. Las mismas letras en las barras no son estadísticamente diferentes. Las líneas en las barras indican la desviación estándar.....	72

CAPÍTULO II.

Figura 1. Curvas de dosis-respuesta del tiabendazol sobre especies del complejo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de aguacate. CR: Crecimiento relativo.....	93
Figura 2. Curvas de dosis-respuesta del tiabendazol sobre especies del complejo <i>Colletotrichum boninense</i> de aguacate. CR: Crecimiento relativo.....	94
Figura 3. Curvas de dosis-respuesta del tiabendazol en especies del complejo <i>Colletotrichum acutatum</i> . CR: crecimiento relativo.....	95
Figura 4. Curva de dosis-respuesta al tiabendazol en el nuevo linaje <i>Colletotrichum</i> sp. 2, perteneciente al complejo <i>Colletotrichum magnum</i> . CR: crecimiento relativo.....	96
Figura 5. Sensibilidad <i>in vitro</i> de azoxistrobin en 11 especies de <i>Colletotrichum</i> causantes de antracnosis del aguacate en México.....	98

INTRODUCCIÓN GENERAL

Colletotrichum es uno de los ascomicetos más estudiados a nivel mundial, ocupó el octavo lugar en importancia debido a la gran diversidad morfológica y genética, distribución y número de hospedantes (Dean *et al.*, 2012). Este género está conformado por diversos complejos de especies crípticas que se diferencian mediante análisis filogenéticos (Weir *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012a, 2012b, 2019; Jayawardena *et al.*, 2016). Actualmente, se conocen 200 especies distribuidas en 14 complejos de especies y otras llamadas ‘especies únicas’, las cuales no se agrupan en algún complejo conocido (Jayawardena *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2019; De Silva *et al.*, 2019). Una especie filogenética puede definirse como el conjunto de organismos que forman un grupo monofilético mediante homología de secuencias de DNA. La separación de especies se lleva a cabo mediante filogenia, complementada con métodos que refuerzan el concepto de especie, como es el Reconocimiento de Especies a través de la Concordancia Genealógica Filogenética (Taylor *et al.*, 2000), y métodos coalescentes como el Proceso del Árbol de Poisson (Kapli *et al.*, 2017) y el Coalescente Generalizado Mezclado de Yule (Fujisawa y Barraclough, 2013). Estos métodos se han utilizado en el reconocimiento y delimitación de especies nuevas de *Colletotrichum* en diversos hospedantes alrededor del mundo. Por ejemplo, a *C. alcornii*, *C. baltimorensis*, *C. somesertense*, *C. zoysiae* (Crouch, 2014), *C. aracearum*, *C. camelliae* (Hou *et al.*, 2016), *C. henanense*, *C. jiangxiense* (Liu *et al.*, 2015), *C. wuxiense* (Wang *et al.*, 2016), *C. conoides*, *C. grossum*, *C. liaoningense* (Diao *et al.*, 2017), *C. ledongense*, *C. bannanense*, *C. australisinense* (Liu *et al.*, 2018a), *C. jinshuiense*, *C. pyrifoliae* (Fu *et al.*, 2019), y diversos nuevos linajes descritos como *Colletotrichum* sp. (Cavalcante *et al.*, 2019).

Entre los hospedantes de *Colletotrichum*, el aguacate es uno de los principales que ataca, siendo este de alta importancia en México; debido a que en el 2018 se cosecharon 2.18 millones de toneladas, de las cuales el 50% se exportaron a Estados Unidos, Europa y

Asia, representando un ingreso de 2,704 millones de dólares (SADER, 2020). México es el principal productor y exportador en el mundo. Aunque existe una gran diversidad genética de variedades e híbridos de aguacate, el cv. Hass es el más cultivado y exportado en México. La producción y calidad de los frutos de aguacate es afectado por la antracnosis, causando caída de frutos o manchas necróticas que merman la calidad de la fruta. *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. acutatum*, *C. karstii*, *C. godetiae* y *C. fructicola* se han registrado como los agentes causales de la antracnosis en Michoacán, Morelos e Hidalgo (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015; Velazquez-del Valle *et al.*, 2016; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018). La identificación de las especies es crucial para mejorar las estrategias de manejo, debido a la diferencia en sensibilidad a fungicidas, algunas presentan fase sexual y difieren en virulencia, mientras que otras son de importancia cuarentenaria (De Silva *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; De Silva *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020).

El control de la antracnosis en México se basa principalmente en la aplicación de fungicidas como los cúpricos, de acción multisitio y que no generan resistencia, así como los sistémicos, de un solo sitio de acción, incluyendo el tiabendazol, azoxistrobin, piraclostrobin, fluoxastrobin, propiconazol, ciprodinil y fludioxonil, autorizados en aguacate para exportación, regulados por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA), y la Asociación de Productores, Empacadores y Exportadores de Aguacate de México (APEAM, 2020). El género *Colletotrichum* se caracteriza por el rápido desarrollo de resistencia a fungicidas con un solo sitio de acción. Se ha reportado resistencia a tiabendazol, tiofanato metílico y azoxistrobin en *C. truncatum* (Torres-Calzada *et al.*, 2015), *C. siamense* (Hu *et al.*, 2015; Chechi *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020), *C. musae* (Vieira *et al.*, 2017), *C. acutatum* (Forcelini *et al.*, 2016), *C. perseae* y *C. fructicola* (Yokosawa *et al.*, 2020). El desarrollo de resistencia puede estar asociada por uno o varios

de los siguientes mecanismos: destoxicación o reducción en la entrada del fungicida a las células, sobreexpresión génica, mutaciones puntuales en los genes de sitio de acción de los ingredientes activos (i.a.), que evitan la unión del fungicida y síntesis enzimas que son capaces de sustituir las funciones de la enzima inhibida por el fungicida (Ma y Michailides 2005; Lucas *et al.*, 2015). El mecanismo más común de resistencia en el caso de *Colletotrichum*, son las mutaciones puntuales, principalmente las estrobilurinas y benzimidazoles; aunque se han reportado pocos casos donde la resistencia a estos fungicidas no se correlaciona con ninguna mutación en el gen donde actúa el fungicida (Baggio *et al.*, 2018; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020).

HIPÓTESIS

1. La diversidad de especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del aguacate es mayor en México, por ser centro de origen del cultivo y por la antigüedad de su domesticación, respecto a otras regiones productoras en el mundo.
2. Los mayores daños de antracnosis del aguacate en México se deben a la aplicación constante de fungicidas con un solo mecanismo de acción y deficiente manejo de la resistencia.

OBJETIVOS

- ❖ Identificar las especies filogenéticas de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis en las principales regiones productoras de aguacate en México.
- ❖ Documentar la distribución de las especies de *Colletotrichum* en México.
- ❖ Estimar la virulencia de cada especie de *Colletotrichum* asociada a la antracnosis.
- ❖ Evaluar la sensibilidad *in vitro* a fungicidas utilizados en las principales regiones productoras en México.

REVISIÓN DE LITERATURA

El cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.)

Origen y cultivares

Persea americana Mill. pertenece a la familia Lauraceae, con las más antiguas plantas con flores (Renner, 1999). Aproximadamente 80 especies del género *Persea* se reconocen como válidas, dispersadas desde el norte de México hasta el sureste de Estados Unidos de Norteamérica, al este en las Indias Occidentales, hacia el sur a través de Centroamérica, Colombia, Venezuela, Guyanas, Brasil, Ecuador, Bolivia, Perú y Chile (Storey *et al.*, 1986). Con el tiempo, *P. americana* se aisló geográficamente, llegando a formar tres razas: Mexicana, Guatemalteca e India Occidental; designadas como var. *drymifolia*, var. *guatemalensis*, y var. *americana*, respectivamente (Bergh y Estrand, 1986). Las tres razas poseen características anatómicas y fisiológicas distintivas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de las tres razas de *Persea americana*

Característica	Razas		
	Mexicana	Guatemalteca	India Occidental
Árbol			
Adaptación climática	Semitropical	Subtropical	Tropical
Tolerancia a frío	Mayormente	Intermedio	Menormente
Tolerancia a salinidad	Menormente	Intermedio	Mayormente
Fruto			
Meses a maduración	6	12	5
Tamaño	Pequeño	Variable	Variable
Pedicelos	Estable	Delgado	Cabeza de clavo
Grosor de exocarpio	Muy delgado	Delgado	Mediano
Exterior del exocarpio	Ceroso	Áspero	Brillante
Tamaño de la semilla	Larga	Pequeña	Variable
Contenido de aceite	Muy alto	Alto	Bajo
Sabor de la pulpa	Condimentado	Almendrado	Suave

Tomado de Bergh y Estrand (1986).

La gran variación dentro de la progenie autofecundante, cuestiona la validez de la definición de razas y especies en el género *Persea* (Mhameed *et al.*, 1997), debido a la dispersión y domesticación de este árbol, de forma independiente en América, a través de diferentes culturas prehispánicas antes de la llegada de los españoles (Galindo-Tovar, *et al.*, 2008).

Producción nacional y exportación

México es el principal productor y exportador de aguacate en el mundo, con más de 2.1 millones de toneladas producidas en 2018. Tan solo en nueve años, la producción aumentó casi 1 millón de toneladas. Estados Unidos de Norteamérica es el principal importador de aguacate mexicano, generando un ingreso anual de más de 2,000 millones de dólares. Otros países importadores son Canadá, Japón, Países Bajos, China, España, Francia, Honduras, El Salvador, Reino Unido y China (SADER, 2020).

En México, Michoacán es el principal productor con 76.6% del total, seguido por Jalisco (9.2%), Estado de México (4.5%), Nayarit (2.6%), Morelos (2.0%), Guerrero (1.1%), Chiapas (0.7%), Puebla (0.7%), Yucatán (0.5%) y Oaxaca (0.4%) (SADER, 2020). En México, el consumo per cápita fue de 7.9 kg en 2018, mientras que en Estados Unidos de Norteamérica se incrementó hasta 3.5 kg (APEAM, 2020). Aunque el cultivo del aguacate genera considerables ingresos, la producción ha traído problemas colaterales, como la deforestación y el desabasto de agua, los cuales son más severos en Michoacán, principal región productora de México (Häberli, 2019).

Principales enfermedades

La producción de aguacate es mermada en rendimiento y calidad por diversos patógenos. A nivel mundial, se han reportado enfermedades en frutos, ramas y raíces, causadas por hongos, bacterias, algas y viroides. Las registradas en la literatura son causadas por algas (*Cephaleuros virescens*) (Vaconcelos *et al.*, 2016); hongos: antracnosis en frutos

y ramas (*Colletotrichum* spp.) (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011; Sharma *et al.*, 2017; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018), pudrición café de raíz (*Phellinus noxius*) (Dann *et al.*, 2009), pudrición común de raíz (*Calonectria ilicicola*, *Cylindrocladium* y *Cylindrocarpon*) (Dann *et al.*, 2012; 2013), mancha por Cercospora (*Pseudocercospora purpurea*) (Marais, 2004; Dann *et al.*, 2013), cancro y muerte descendente de ramas (especies de Botryosphaeriaceae) (McDonald y Eskalen, 2011; Valencia *et al.*, 2019), enfermedad del Laurel (*Raffaelea lauricola* y *R. canadiensis*) (Eskalen y McDonal, 2011; Ploetz *et al.*, 2012; 2017), pudrición de raíz por Armillaria (*Armillaria* spp.) (Dann *et al.*, 2013; Elías-Román *et al.*, 2018), mancha de asfalto (*Phyllachora gratissima*) (Dann *et al.*, 2013), pudrición por Verticillium (*Verticillium* spp.) (Dann *et al.*, 2013; Markakis *et al.*, 2014), pudrición blanca de raíz (*Rosellinia necatrix*) (Arjona-Girona *et al.*, 2017), tristeza del aguacatero (*Phythophthora cinnamomi*) (Ochoa-Fuentes *et al.*, 2015; Ramírez-Gil *et al.*, 2016), cenicilla (*Oidium perseae-americanae* y *Podosphaera perseae-americanae*) (Liberato y Barreto, 2006; Siahaan *et al.*, 2016), roña (*Sphaceloma perseae*), mancha plateada (*Mycosphaerella perseae*), fumagina (*Capnodium* spp.), pudrición de pedúnculo (*Botryosphaeria*, *Thyronectria pseudotrichia*, *Phomopsis*, *Fusarium* spp., *Pestalotiopsis* y *Rhizopus*) (Dann *et al.*, 2013; Twizeyimana *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2020). Además, las causadas por bacterias: cancro bacteriano (*Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris*), pudrición bacteriana suave en fruto (*Pectobacterium carotovorum*), hoja corchosa (*Xylella fastidiosa*) (Dann *et al.*, 2013); así como la provocada por el viroide mancha de sol (*Avocado sunblotch viroid*) (Saucedo-Carabez *et al.*, 2014).

Identificación molecular de hongos

Se estima que existe un total de 2.2 a 3.8 millones de especies fungosas en el planeta, de las cuáles, solamente se han descrito 120,000 (Hawksworth y Lücking, 2018). La identificación

a nivel especie es crucial para investigaciones básicas (ecología y taxonomía) y aplicadas (genómica comparativa, bioprospección, cuarentena de patógenos). Además, el diagnóstico preciso juega un papel relevante en la prevención de la dispersión de fitopatógenos cuarentenados y el manejo óptimo de las epidemias (Luchi *et al.*, 2020).

Con avances en la biología molecular, desde el descubrimiento de la estructura del DNA, desarrollo de la técnica de PCR y la secuenciación, se ha intensificado la identificación molecular de cualquier organismo vivo. El apogeo de la aplicación de estas técnicas en hongos, surgió hace solamente dos décadas, principalmente en Estados Unidos de Norteamérica y Países Bajos. En México, pocos estudios de hongos fitopatógenos se han realizado en esta área de investigación, implementando análisis filogenéticos multilocus. Algunos géneros importantes estudiados en México, con este enfoque, son *Lasiodiplodia*, *Neopestalotiopsis* y *Colletotrichum*, en los cuales pocos aislamientos se secuenciaron para el análisis molecular (<100) (Cristobal-Martínez *et al.*, 2017; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018; Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Juárez-Vázquez *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020; Rebollar-Alviter *et al.*, 2020; Tovar-Pedraza *et al.*, 2020). Esto se refleja en el desconocimiento de la gran diversidad de hongos fitopatógenos aún no estudiados en cultivos importantes, como durazno, vid, pera, berries, cítricos y hortalizas. Esta falta de estudios puede deberse a que, las técnicas moleculares utilizadas para la identificación y detección de hongos fitopatógenos, necesitan ser más robustas, económicas y fáciles de realizar; debido a que, en países en desarrollo, estas tecnologías son caras e inviables para aplicarse a gran escala (Aslam *et al.*, 2017).

El concepto y delimitación de especies de hongos

El concepto de especie ha evolucionado con el tiempo, y ha dependido de las herramientas tecnológicas y técnicas para el estudio de los seres vivos. Se han descrito diversos conceptos

según el área de estudio. Sin embargo, se ha tratado de unificar este concepto para todas las ramas de las ciencias biológicas (De Queiroz, 2007). En Micología, este concepto ha pasado a través de las delimitaciones biológica, morfológica, de compatibilidad vegetativa, molecular y filogenética (Taylor *et al.*, 2000). El término “especie filogenética” se define como “el menor grupo monofilético inclusivo definible por al menos una autapomorfía” (Hull, 1997). En este contexto, monofilético se refiere a “un grupo donde se incluye un taxón ancestral y todos sus descendientes, descrito frecuentemente como clado en la literatura” (Baum, 2008), y la autapomorfía, como “rasgos que se encuentran en un solo miembro del grupo” (McLennan, 2010); o más precisamente, como “un estado de carácter derivado que se observa en un solo taxón de un grupo de datos determinado” (Lemey *et al.*, 2009; Braum y Smith, 2013).

Taylor *et al.* (2000) propuso el método de Reconocimiento de Especies a través de la Concordancia Genealógica Filogenética (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition, GCPSR), que se enfoca en delimitar las especies usando análisis filogenético multilocus. Este consiste en reconstruir un árbol filogenético por cada locus comúnmente utilizado en los grupos de organismos correspondientes; posteriormente, se visualiza si existe concordancia de cada clado, donde el límite de las especies lo define el clado donde no existe traslape entre las ramas de cada árbol. Es decir, el método se basa en la detección de recombinación genética entre clados cercanos. Con base en esto, se desarrolló una prueba estadística simple y robusta para detectar recombinación genética utilizando alineamientos de secuencias de DNA, llamada Índice de Homoplasia por Pares (Pairwise Homoplasy Index, PHI) (Bruen *et al.*, 2006).

El método de GCPSR usando PHI es ampliamente utilizado para delimitar y reconocer especies filogenéticas de hongos, incluyendo complejos en la cual la delimitación es complicada, debido a la presencia de especies crípticas. Algunos géneros fitopatógenos

importantes, en los cuales se ha aplicado este método son *Colletotrichum* (Crouch, 2014; Liu *et al.*, 2015; Diao *et al.*, 2017; Hassan *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2019) y *Fusarium* (Laurence *et al.*, 2014; Sandoval-Denis *et al.*, 2018; Lombard *et al.*, 2019; Sandoval-Denis *et al.*, 2019). Aunque se han adoptado estos enfoques, también se han integrado diversas pruebas para delimitar con mayor precisión las especies, incluyendo métodos coalescentes como el Poisson Tree Processes (Kapli *et al.*, 2017) y Generalized Mixed Yule-coalescent processes (Fujisawa y Barraclough, 2013), que se ha utilizado para delimitar especies en los géneros *Colletotrichum* (Liu *et al.*, 2016), *Aspergillus* (Hubka *et al.*, 2018; Sklenar *et al.*, 2020), *Gymnosporangium* (Zhao *et al.*, 2016) y *Beauveria* (Bustamante *et al.*, 2019). Los escasos trabajos utilizando estos métodos para la delimitación de especies de hongos realizados en el mundo, reflejan el desacuerdo existente en la comunidad científica micológica para definir y establecer una estrategia universal para la delimitación de especies; debido a que existen otros métodos que pueden integrarse para el mismo propósito en cualquier ser vivo (Leavitt *et al.*, 2015).

El género *Colletotrichum*

Las especies de *Colletotrichum* se han reportado principalmente como patógenos, pero además como endófitos y saprófitos, en diferentes partes del mundo y en ambientes terrestres y acuáticos (Wijayawardene *et al.*, 2017). La identificación de especies del se ha vuelto una tarea difícil, debido a la gran diversidad morfológica y cultural, además de la ambigüedad que existe en los métodos para delimitarlas (Cai *et al.*, 2009). A continuación, se revisan aspectos principales de este género.

Taxonomía

El género *Colletotrichum* se introdujo por Corda en 1831 para describir la especie *C. lineola*, como parte de la familia *Glomerellaceae* (Wijayawardene *et al.*, 2017). Posteriormente, con la publicación de Arx en 1957, la taxonomía se basó en características morfológicas, sin considerar la patogenicidad (Cannon *et al.*, 2012). Para identificar especies del género *Colletotrichum* se han utilizado características morfológicas y culturales, incluyendo tamaño y forma de conidios y apresorios, presencia o ausencia de setas, esclerocitos, acérvulos y fase sexual, color y textura de la colonia y tasa de crecimiento *in vitro* (Hyde *et al.*, 2009). No fue hasta la primera reunión internacional sobre *Colletotrichum* en la Universidad de Bath, UK en 1990, donde se propuso la aplicación de la biología molecular en la taxonomía (Cannon *et al.*, 2012). Desde entonces, la taxonomía evolucionó desde el uso de secuencias de DNA, reconstrucción de árboles filogenéticos usando la región ITS, hasta la actualidad, donde se utilizan genes housekeeping (genes que se expresan constantemente debido a su esencialidad en el metabolismo celular) para análisis multilocus.

Actualmente se aceptan más de 200 especies de *Colletotrichum* identificadas mediante análisis filogenético multilocus, distribuidas en 14 complejos de especies (Jayawardena *et al.*, 2016; Marin-Felix *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2020), y diversas especies que aún no se agrupan en ningún complejo descrito (Jayawardena *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2019). Cada complejo de especies se estudia mediante el análisis de diversas regiones genómicas, siendo los más comunes, los de la región ITS, y los genes que codifican para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, actina, tubulina, quitina sintetasa, e histona. En complejos como *C. gloeosporioides* donde existe mayor dificultad para la delimitación de especies, se han agregado los genes glutamina sintetasa y de compatibilidad vegetativa (Vieira *et al.*, 2020).

Morfología

La mayoría de las especies presentan la fase asexual, y solamente algunas muestran la sexual. Este género es ampliamente diverso en morfotipos y presenta diversidad interespecífica o intraespecífica. A continuación, se describen de forma general las principales estructuras (Marin-Felix *et al.*, 2017):

Conidios: son cilíndricos, agudos en los extremos, fusiformes, irregulares y ovalados; miden de 10-30 x 3-7 µm. En la mayoría de las especies son hialinos, lisos o rugosos en la superficie. Algunos con hilo prominente o apéndice filiforme. *Apresorios* solos o en grupo, café oscuro a negro claros, globosos o irregulares, con márgenes lisos, ondulados o irregulares. *Ascas* presentes en algunas especies, unitunicadas, cilíndricas con 8 ascosporas. *Ascosporas* sin septos, hialinas y con paredes lisas, de formas cilíndrica, oval o fusiforme, rectas o curvadas. *Setas* presentes o ausentes en medio de cultivo, la mayoría café oscuras, con 1 a 8 septos, gruesas en la base con tendencia suave hacia el ápice. *Conidomatas* acervulares, visibles en medio de cultivo, color anaranjado, tornándose café a negro con el tiempo; se producen masivamente en medio Spezieller Nahrstofffarmer agar (SNA) amendado con fasículas de pino. *Colonias* algodonosas, planas, con poco o abundante micelio aéreo, márgenes crenados, lisos, dentados o irregulares. Micelio de color blanco, oliváceo, rosado, café oscuro y sus combinaciones. Algunas especies producen conidiomatas acervulares visibles o escondidos en el micelio. El reverso del micelio con aglomeraciones de puntos café oscuros, color anaranjado uniforme o con anillos café oscuro concéntricos. Variación en la tasa de crecimiento, dependiendo de la especie y condiciones de crecimiento.

***Colletotrichum* como patógeno**

Colletotrichum es el agente causal de la antracnosis, caracterizada por la formación de lesiones hundidas sobre frutos, ramas, flores, bulbos y hojas (Cannon *et al.*, 2012);

síntomas típicos de este género; sin embargo, se ha reportado a *Elsinöe ampelina* causando antracnosis en hojas y tallos en vid en Brasil y Australia (Santos *et al.*, 2018a, b). *Colletotrichum* se ha reportado como causante de pudriciones en tallo de maíz (*Zea mays*) (Cota *et al.*, 2012; Sanz-Martín *et al.*, 2016), tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) (Cakir *et al.*, 2019), corona de fresa (*Fragaria × ananassa*) (Mangandi *et al.*, 2015) y raíz en jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Vrisman *et al.*, 2017; Fealko *et al.*, 2019).

Colletotrichum presenta cuatro tipos de ciclo de vida: necrotrófico, hemibiotrófico, latente y endofítico, los cuales dependen de la especie de *Colletotrichum*, madurez fisiológica del hospedante y las condiciones ambientales; sin embargo, el tipo hemibiotrófico es el más común (De Silva *et al.*, 2017). Los necrotróficos infectan y colonizan activamente las células vegetales causando la muerte celular mediante la secreción de enzimas líticas o toxinas (Van Kan 2006; De Silva *et al.*, 2017). Los hemibiotróficos presentan una etapa biotrófica en etapa temprana del ciclo biológico, seguido por un cambio a la etapa necrotrófica (De Silva *et al.*, 2017). Esta transición se debe a diferentes perfiles de expresión génica, donde efectores y enzimas del metabolismo secundario se inducen en la etapa biotrófica, posteriormente hidrolasas y transportadores se sobreexpresan disparando la etapa necrotrófica (O'Connell *et al.*, 2012). En la etapa latente, *Colletotrichum* spp. permanecen dormantes dentro del hospedante por tiempo amplio antes de entrar en la fase activa. La transición de esta última etapa, a necrotrófica, puede deberse al declive en la producción de sustancias antifúngicas como polifenoles y fitoalexinas, o a las condiciones de pH del hospedante (Prusky *et al.*, 2013).

***Colletotrichum* como endófito**

Un organismo endófito puede definirse como aquel que pasa su ciclo biológico, o parte de este, en tejidos sin síntomas aparentes. En los últimos años se ha puesto mayor atención a la

diversidad de especies de *Colletotrichum* aisladas de tejidos asintomáticos, de las cuales, la mayoría son nuevas para la ciencia. Por ejemplo, recientemente se han descrito a *C. blettillum*, *C. caudasporum*, *C. duyunensis*, *C. endophytum*, *C. excelsum-altitudum*, *C. guizhouensis* y *C. ochracea* en *Bletilla ochracea* (Tao *et al.*, 2013), *C. carinefi*, *C. chiangraiense*, *C. doitungense*, *C. parallellophorum* y *C. watphraense* en *Denrobiium* spp. (Ma *et al.*, 2018), *C. jishouense* y *C. tongrenense* en *Nothopodytes pittosporoides* (Zhou *et al.*, 2019) y *C. endophityca* en *Pennisetum purpureum* (Manamgoda *et al.*, 2013). Una gran diversidad de especies descritas se ha aislado como endófitas en diversos hospedantes (Rashmi *et al.*, 2019). Sin embargo, la mayoría de estas especies también se han aislado de tejidos con síntomas en el mismo hospedante (Vieira *et al.*, 2014; Lisboa *et al.*, 2018; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020). Esta etapa endofítica está relacionada con la expresión diferencial de genes involucrados en la patogenicidad, como son aquellos que codifican proteínas efectoras secretadas, y módulos de unión de carbohidratos, especialmente los de quitina (Hacquard *et al.*, 2016).

Ciclo de vida de *Colletotrichum*

La antracnosis del aguacate es causada por diversas especies de *Colletotrichum*. En México se han reportado a *C. fructicola*, *C. godetiae* y *C. karsti* (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015; Velázquez-del Valle *et al.*, 2016; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018), además de nueve especies identificadas en este estudio, incluyendo dos nuevos linajes (Capítulo II). La antracnosis se manifiesta en regiones con humedad relativa mayor al 80% (Prusky *et al.*, 2007). El ciclo de la enfermedad, en forma general, inicia con la deposición de conidios o ascosporas sobre los frutos, hojas y ramas. Despues de la germinación conidial (temperatura óptima de 23 a 27.7 °C) (Leandro *et al.*, 2001), las hifas penetran a las células previa formación de apresorios, los cuales se desarrollan a una temperatura óptima de 18 a 26.5 °C

(Leandro *et al.*, 2001). Rodríguez-López *et al.* (2013) encontraron en experimentos *in vitro*, que *C. gloeosporioides* no diferenció apresorios como medio de penetración, pero si formó una capa mucilaginosa compuesta por cutinasas y esterasas, que permitieron la infección al degradar la cutícula del fruto (Dickman *et al.*, 2003).

Una vez que penetra a las células, el patógeno manifiesta la forma biotrófica, pasando posteriormente a la fase necrotrófica o quiescente; en la cual, secreta amonio y se acumula en el sitio de infección, aumentando el pH a un óptimo de 7.5 a 8.0. (Prusky *et al.*, 2007). En esta etapa afecta y esporula en frutos o ramas, y genera inóculo secundario. La etapa quiescente pasa a la etapa necrotrófica cuando los frutos empiezan a madurar, generalmente en postcosecha, lo cual genera inóculo secundario. El inóculo, en forma de apresorios, conidios, ascas o micelio, se conserva en ramas, hojas y frutos que quedan en el suelo hasta el siguiente ciclo de cultivo (Norman y Strandberg, 1997; Freeman *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2017), los cuales se activan y dispersan por la lluvia y el viento. Aunque algunas especies de *Colletotrichum* forman esclerocios y clamidosporas que sobreviven en el suelo (Nair *et al.*, 1983); sin embargo, no se ha demostrado la formación de estas estructuras en especies que infectan al aguacate. Diversos estudios sugieren que los hongos endófitos, pueden pasar a la etapa necrotrófica por la influencia de factores abióticos, como el cambio en el balance nutricional de la planta (Álvarez-Loayza *et al.*, 2011); por lo tanto, se sugiere que la etapa endofítica es una transición prolongada a la fase necrotrófica.

Algunas especies que afectan al aguacate, como *C. jiangxiense*, *C. chrysophilum*, *C. karsti* y *C. godetiae*, presentan la etapa sexual, la cual permite mayor variabilidad genética de la progenie. Esta fase invernante, pasa a los siguientes ciclos de cultivo de forma similar, mediante apresorios o micelio (Damm *et al.*, 2012b; Vieira *et al.*, 2014).

Manejo

En México, la aplicación calendarizada de fungicidas de contacto y sistémicos, es la primera opción de manejo, de la mayoría de los productores. La APEAM en coordinación con el SENASICA, establecieron los fungicidas permitidos para la aplicación en este cultivo, que incluyen compuestos cúpricos y sistémicos (con un sitio de acción). Además, la poda es una estrategia para mejorar la aireación y reducir la humedad relativa alta favorable para el desarrollo de antracnosis. Otras opciones consisten en la aplicación de inductores de resistencia y micronutrientes. En otras partes del mundo, se colectan y desechan frutos, ramas y hojas infectadas que caen al suelo, los cuales son fuente de inóculo (Hartill, 1991).

Fungicidas para el manejo de antracnosis en aguacate

La aplicación de fungicidas en el cultivo de aguacate es indispensable para mantener la calidad en las etapas de pre y post cosecha de los frutos. La APEAM tiene recomendados los siguientes fungicidas para su aplicación en este cultivo: azoxistrobin, piraclostrobin, propiconazol, compuestos de azufre (azufre elemental), compuestos de cobre (oxicloruro de cobre, hidróxido cúprico, octanoato de cobre, oleato cúprico, óxido cuproso, sulfato cuprocálcico, sulfato de cobre, tribásico de cobre), ciprodinil + fludioxonil, folpet, thiram y tiabendazol.

Mecanismos de resistencia a fungicidas

Benzimidazoles

Los benzimidazoles tienen como mecanismo de acción la inhibición de la división celular por la unión de estas moléculas con la tubulina, impidiendo el ensamblaje de los microtúbulos (FRAC, 2020). Aparecieron en el mercado al inicio de 1960; actualmente se comercializan el carbendazim, benomil, tiabendazol, tiofanato-metílico y fuberidazol, para el control de diversos fitopatógenos y algunos Basidiomycetes. Sin embargo, más de 100 especies de

hongos han desarrollado resistencia a benzimidazoles (Young, 2015). Diversas mutaciones puntuales en el gen tubulina se ha correlacionado con la resistencia a estos fungicidas en diversos hongos fitopatógenos, comúnmente en los aminoácidos 6, 50, 167, 198, 200 y 240 (Ma y Michailides, 2005). Sin embargo, en el género *Colletotrichum*, las mutaciones más comunes son E198A (ácido glutámico a alanina) y F200Y (fenilalanina a tirosina) en la subunidad beta de la tubulina (β -tubulina) (Young *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2016; Ramdial *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2018; Chechi *et al.*, 2019). Se han reportado diversas especies de *Colletotrichum* altamente resistentes, que no poseen ninguna mutación en este gen. Por ejemplo, Baggio *et al.* (2018) encontró una población resistente de *C. acutatum* a tiofanato-metílico (100 mg L⁻¹), sin exhibir mutación en el gen β -tubulina. Resultados similares se encontraron para una población de *C. siamense* altamente resistente (> 1000 mg L⁻¹) a este compuesto (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020).

Estrobilurinas

Las estrobilurinas pertenecen al grupo QoI (inhibidores de la quinona externa), las cuales intervienen con la transferencia de electrones en el sitio Qo (fuera del sitio de oxidación del quinol) en el complejo citocromo bc1 de la cadena de respiración mitocondrial (FRAC, 2020). Estos son uno de los pocos fungicidas que tienen un amplio espectro de control, incluyendo Ascomicetos, Deuteromicetos, Basidiomicetos y Oomicetos (Sierotzki, 2015). Sin embargo, este grupo es uno de los más rápidos en el desarrollo de resistencia. Por ejemplo, se detectó resistencia de cenicillas en cereales y cucurbitáceas, mildiús en hortalizas y sigatoka negra en banano a solo dos años de la introducción en el mercado (Sierotzki *et al.*, 2000; Sierotzki, 2015). Como en la mayoría de los fungicidas, con un solo sitio de acción, la resistencia está correlacionada con mutaciones en el gen de unión de los ingredientes activos, incluyendo la del aminoácido 143 de glicina a alanina (G143A) en el

gen *cytb*, que es el mecanismo de resistencia más frecuente a los QoI en diversos hongos fitopatógenos (Sierotzki, 2015). En *Colletotrichum*, esta mutación se ha confirmado en aislamientos resistentes a estrobilurinas (Hu *et al.*, 2015; Forcelini *et al.*, 2018; Chechi *et al.*, 2019; Ren *et al.*, 2020); aunque también se ha detectado la mutación de fenilalanina a leucina en la posición 129 (F129L) en *C. acutatum* (Forcelini *et al.*, 2016).

Este grupo de fungicidas posee efectos positivos en la fisiología de las plantas. Uno de los más conocidos es el “efecto verde”, debido a que la aplicación de estrobilurinas mantiene verde el área foliar del cultivo, permitiendo un mejor llenado de los granos en cereales (Bartlett *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que diferentes estrobilurinas retardan la senescencia del trigo y gingseng (*Panax ginseng*) mediante el mejoramiento en la actividad enzimática antioxidante (Wu y Tiedemann, 2001; Liang *et al.*, 2018), mitigan la salinidad e incrementan la clorofila en jitomate (Boari *et al.*, 2019), y aumentan la intensidad fotosintética en maíz bajo estrés por sequía (Sulewska *et al.*, 2019).

Triazoles

Los triazoles tienen como mecanismo de acción inhibir la desmetilación de los esteroles (fungicidas DMI), al igual que los imidazoles (FRAC, 2020). Desde 1990, se introdujeron 14 nuevos triazoles (tetraconazol, fenbuconazol, epoxiconazol, triticonazol, bromuconazol, metconazol, ipconazol, fluquinconazol, imebenconazol, simeconazol, protoconazol, mefentrifluconazol, ipfentrifluconazol y pyrisoxazol), que en la actualidad dominan el mercado mundial en esta familia química (Stenzel y Vors, 2019). El propiconazol sigue distribuido comercialmente en México; ofrece un amplio espectro para el control de manchas de hojas y royas en cereales y *Musa* spp. Además, se ha demostrado la eficacia contra diversas especies de *Colletotrichum* aisladas de *Hevea brasiliensis* y *P.*

persica (Chen *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2017). En México se ha autorizado el uso del propiconazol en cultivos como el aguacate.

Se ha encontrado alta resistencia a tebuconazol, metconazol, flutriafol y fenbuconazol en aislamientos de *C. truncatum*; además de resistencia a flutriafol y fenbuconazol en *C. nympheae*, con CE50 mayores a 50 mg L⁻¹ (Chen *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018). En otro estudio, se encontró que aislamientos de *C. truncatum* fueron resistentes a tebuconazol (CE50 > 40 mg L⁻¹) y miclobutanol (CE50 > 100 mg L⁻¹), pero sensibles a epoxiconazol y difenoconazol (Zhang *et al.*, 2017). Se ha correlacionado la “resistencia innata” a algunos triazoles en *C. truncatum* debido a mutaciones puntuales en los genes *CYP51A* (L208Y, H238R, S302A, I366L) y *CYP51B* (H373N, M376L, S511T), y no con la sobreexpresión génica de estos (Chen *et al.*, 2018). Esta hipótesis de “resistencia innata” se soporta debido a que, en otros complejos de especies, no se ha encontrado resistencia a fungicidas DMI, en estudios donde no se han aplicado triazoles, por ejemplo, se obtuvieron valores de CE50 < 1 mg L⁻¹ con propiconazol y tebuconazol en especies de los complejos *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Xu *et al.*, 2014; Baggio *et al.*, 2018; Chechi *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2020). El desarrollo de resistencia por la presión de selección, también se ha correlacionado con mutaciones puntuales en el complejo *C. gloeosporioides*, en *CYP51A* (L58V, S175P, A340S, T379A, N476T) y *CYP51B* (D121N, T132A, F391Y) (Wei *et al.*, 2020). La diferencia en las mutaciones puntuales se debe a la posible especificidad de unión de los triazoles con las enzimas que codifican *CYP51A* o *CYP51B*, en diferentes especies de *Colletotrichum* (Chen *et al.*, 2020).

Fenilpirroles

La resistencia a fludioxonil se ha correlacionado con mutaciones puntuales (R632I y delección en 497) en el gen *Mrr1* (Li, *et al.*, 2014; Fernández-Ortuño, *et al.*, 2015), además

de la sobreexpresión de este gen. Sin embargo, se han demostrado diversas mutaciones en mutantes de campo resistentes, en la histidina quinasa, adenil ciclase, proteína metil aceptadora de la quimiotaxis y los dominios de la fosfatasa (HAMP) de la región N-terminal, mientras que en los mutantes de laboratorio se han observado las mutaciones en la HAMP y el dominio HATPasa_c de la región C-terminal (Ren *et al.*, 2016). En otros estudios tampoco se han detectado las mutaciones en el gen *Mrr1* (Jurick II *et al.*, 2017). Chen *et al.* (2017) demostraron que el gen *AaMFS19* que codifica para el transportador MFS (Major Facilitator Family) es requerido para la resistencia celular al estrés oxidativo y fungicidas (incluyendo fludioxonil) en *Alternaria alternata*. Además, aunque no se conoce con certeza el mecanismo de acción del fludioxonil, el tratamiento con este fungicida en hongos induce la muerte mediante disrupción en MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Kojima *et al.*, 2006; Bahn *et al.*, 2007; Degani 2015), lo cual sugiere una disrupción en la ruta de la osmorregulación. Li *et al.* (2014) secuenciaron 4 genes involucrados en la osmorregulación en *Botrytis cinerea*; sin embargo, no encontraron mutaciones puntuales correlacionadas con la resistencia en aislamientos sensibles y resistentes.

Concentraciones efectivas 50 (CE50) en estudios *in vitro*

En experimentos *in vitro* se debe calcular el efecto de los fungicidas sobre el crecimiento micelial y/o germinación conidial, a través de la concentración efectiva 50 (CE50). La CE50 se define como la dosis de fungicida que inhibe el crecimiento micelial en un 50% cuando se compara con el crecimiento en el tratamiento control (sin fungicida) (FRAC, 2020). En diversos estudios, generalmente, se utiliza la regresión lineal entre las transformaciones logarítmicas de las concentraciones y los porcentajes de inhibición o crecimiento relativo de la colonia para el cálculo de las CE50s (Torres-Calzada *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019a, Liu *et al.*, 2019b). Sin

embargo, los datos relativos a la inhibición micelial pueden ajustarse mucho mejor a modelos no lineales (Noel *et al.*, 2018), como los horméticos y no horméticos (Noel *et al.*, 2018). La hormesis se define como la estimulación del crecimiento micelial a concentraciones de ingredientes activos (i.a.) bajos, sin embargo, los mecanismos que resultan en este fenómeno no se han estudiado a profundidad en hongos fitopatógenos.

LITERATURA CITADA

- Álvarez-Loayza, P., J. F. White, M. S. Torres, H. Balslev, T. Kristiansen, *et al.*, 2011. Light converts endosymbiotic fungus to pathogen, influencing seedling survival and niche-space filling of a common tropical tree, *Iriartea deltoidea*. PLoS ONE 6:e16386.
- APEAM (Asociación de Productores, Empacadores y Exportadores de Aguacate de México). Plaguicidas autorizados. Disponible en: <http://www.apeamac.com>
- Arjona-Girona, I., T. Ariza-Fernández, and C. J. López-Herrera. 2017. Contribution of *Rosellinia necatrix* to avocado white root rot. Eur. J. Plant Pathol. 148:109–117.
- Aslam, S., A. Tahir, M. F. Aslam, M. W. Alam, A. A. Shedai, and S. Sadia. 2017. Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. J. Plant Interact. 12:493–504.
- Bahn, Y. S., S. Geunes-Boyer, and J. Heitman. 2007. Ssk2 Mitogen-activated protein kinase kinase-kinase governs divergent patterns of the stress-activated Hog1 signaling pathway in *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot. Cell 6:2278–2289.
- Baggio, J. S., N. Y. Wang, N. A. Peres, and L. Amorim. 2018. Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin, difenoconazole and thiophanate-methyl. Trop. Plant Pathol. 43:533-542.
- Bartlett, D. W., J. M. Clough, J. R. Godwin, A. A. Hall, M. Hamer, and B. Parr-Dobrzanski. 2002. The strobilurin fungicides. Pest Manag. Sci. 58:649–662.
- Baum, D. 2008. Reading a phylogenetic tree: the meaning of monophyletic groups. Nat. Edu. 1:190.
- Baum, D. A., and S. D. Smith. 2013. Tree thinking: an introduction to phylogenetic biology. Roberts and Company Publishers, Inc. USA. 476 p.
- Bautista-Cruz, M. A., G. Almaguer-Vargas, S. G. Leyva-Mir, M. T. Colinas-León, K. C. Correira, N. Camacho-Tapia, *et al.* 2019. Phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associate with cankers and dieback symptoms of Persian lime in Mexico. Plant Dis. 103:1156–1165.
- Berg, B. O., and N. C. Estrand. 1986. Taxonomy of the avocado. California Avo. Soc. Yearbook 70:135–145.

- Boari, F., V. Cantore, D. D. Venere, L. Sergio, V. Candido, and M. I. Schiattonne. 2019. Pyraclostrobin can mitigate salinity stress in tomato crop. *Agric. Water Manag.* 222:254–264.
- Bruen, T. C., H. Philippe, and D. Bryant. 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172:2665–2681.
- Bustamante, D. E., M. Oliva, S. Leiva, J. E. Mendoza, L. Bobadilla, G. Angulo, and M. S. Calderon. 2019. Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviensis* sp. nov. *MycoKeys* 58:47–68.
- Cai, L., K. D. Hyde, P. W. J. Taylor, B. Weir, J. M. Waller, et al. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers.* 39:183–204.
- Cakir, E., A. Karahan, and I. Kurbetli. 2019. Involvement of *Colletotrichum coccodes* causing atypical symptoms of potato tubers in Turkey. *J. Plant Dis. Prot.* 126:173–176.
- Cannon, P. F., U. Damm, P. R. Johnston, and B. S. Weir. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73:181–213.
- Cao, X., X. Xu, H. Che, J. S. West, and D. Luo. 2017. Distribution and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species complexes from rubber tree in Hainan, China. *Plant Dis.* 101:1774–1780.
- Cao, X., X. Xu, H. Che, J. S. West, and D. Luo. 2019. Three *Colletotrichum* species, including a new species, are associated to leaf anthracnose of rubber tree in Hainan, China. *Plant Dis.* 103:117–124.
- Cavalcante, G. R. S., B. M. Barguil, W. A. S. Vieira, W. G. Lima, S. J. Michereff, V. P. Doyle, and M. P. S. Camara. 2019. Diversity, prevalence, and virulence of *Colletotrichum* species associated with lima bean in Brazil. *Plant Dis.* 103:1961–1966.
- Chechi, A., J. Stahlecker, M. E. Dowling, and G. Schnabel. 2019. Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. *Pestic. Biochem. Physiol.* 158:18–24.
- Chen, S., M. Hu, G. Schnabel, D. Yang, X. Yan, and H. Yuan. 2020. Paralogous *CYP51* genes of *Colletotrichum* spp. mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* 110:615–625.
- Chen, S., Y. Wang, G. Schnabel, C. A. Peng, S. Lagishetty, K. Smith, C. Luo, and H. Yuan. 2018. Inherent resistance to 14 α -demethylation inhibitor fungicides in *Colletotrichum truncatum* is linked to *CYP51A* and/or *CYP51B* gene variants. *Phytopathology* 108:1263–1275.
- Chen, L. H., H. C. Tsai, P. L. Yu, and K. R. Chung. 2017. A major facilitator superfamily transporter-mediated resistance to oxidative stress and fungicides requires Yap1, Skn7, and MAP kinases in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *PLoS ONE* 12:e0169103.
- Chen, S. N., C. X. Luo, M. J. Hu, and G. Schnabel. 2016. Sensitivity of *Colletotrichum* species, including *C. fioriniae* and *C. nymphaeae*, from peach to demethylation inhibitor fungicides. *Plant Dis.* 100:2434–2441.

- Cota, L. V., R. V. da Costa, D. D. Silva, C. R. Casela, and D. F. Parreira. 2012. Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in Brazilian conditions. *J. Phytopathol.* 160:680–684.
- Cristobal-Martínez, A. L., M. J. Yáñez-Morales, R. Solano-Vidal, O. Segura-León, and A. M. Hernández-Anguino. 2017. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *Eur. J. Plant Pathol.* 147:605–614.
- Crouch, J. A. 2014. *Colletotrichum caudatum* s.l. is a species complex. *IMA Fungus* 5:17–30.
- Damm, U., P. F. Cannon, J. H. Woudenberg, P. R. Johnston, B. S. Weir, Y. P. Tan, R. G. Shivas, and P. W. Crous. 2012a. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Stud. Mycol.* 73:1–36.
- Damm, U., P. F. Cannon, J. H. Woudenberg, and P. W. Crous. 2012b. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73:37–113.
- Damm, U., T. Sato, A. Alizadeh, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2019. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Stud. Mycol.* 92:1–46.
- Dann, E. K., A. W. Cooke, L. I. Forsberg, K. G. Pegg, Y. P. Tan, and R. G. Shivas. 2012. Pathogenicity studies in avocado with three nectriaceous fungi, *Calonectria ilicicola*, *Gliocladiopsis* sp. and *Ilyonectria liriiodendri*. *Plant Pathol.* 61:896–902.
- Dann, E. K., R. C. Ploetz, L. M. Coates, and K. G. Pegg. 2013. Foliar, fruit and soilborne disease. In: The avocado. Botany, production and uses. Second Edition. Schaffer B, Wolstenholme BN, Whiley AW (Eds.). CAB International. UK. Pp: 380–422.
- Dean, R., J. A. L. Van Kan, Z. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. D. Pietro, et al. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathol.* 13:414–430.
- Diao, Y. Z., C. Zhang, F. Liu, W. Z. Wang, L. Liu, L. Cai, and X. L. Liu. 2017. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. *Persoonia* 38:20–37.
- De Silva, D. D., P. W. Crous, P. K. Ades, K. D. Hyde, and P. W. J. Taylor. 2017. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biol. Rev.* 31:155–168.
- De Silva, D. D., J. Z. Groenewald, P. W. Crous, P. K. Ades, A. Nasruddin, O. Mongkolporn, and P. W. J. Taylor. 2019. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. *IMA Fungus* 10:8.
- Degani, O. 2015. Mediation of fludioxonil fungicide activity and resistance through *Cochliobolus heterostrophus* G-protein and MAPK signaling pathways. *Phytoparasitica* 43:215–228.
- De Queiroz, K. 2007. Species concept and species delimitation. *Systematic Biology* 56:879–886.

- Dickman, M. B., Y. S. Ha, B. Adams, and C. A. Huang. 2003. A protein kinase from *Colletotrichum trifolii* is induced by plant cutin and is required for apressorium formation. MPMI 16:411–421.
- Elías-Román, R. D., R. Medel-Ortíz, D. Alvarado-Rosales, J. W. Hanna, A. L. Ross-Davis, M. S. Kim, and N. B. Klopfenstein. 2018. *Armillaria mexicana*, a newly described species from Mexico. Mycologia 110:347–360.
- Eskalen, A., and V. McDonal. 2011. First report of *Raffaelea canadensis* causing laurel wilt disease symptoms on avocado in California. Plant Dis. 95:1189.
- Fealko, E., D. Szarka, A. Lamb, B. Amsden, J. Beale, and E. Pfeifer. 2019. First report of black dot root rot, caused by *Colletotrichum coccodes*, in tomato in Kentucky high tunnels. Plant Dis. 103:2126.
- Fernández-Orduño, D., A. Grabke, X. Li, and G. Schnabel. 2015. Independent emergence of resistance to seven chemical classes of fungicides in *Botrytis cinerea*. Phytopathology 105:424–432.
- Forcelini, B. B., T. E. Seijo, A. Amiri, and N. A. Peres. 2016. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. Plant Dis. 100:2050–2056.
- Forcelini, B. B., C. S. Rebello, N. Y. Wang, and N. A. Peres. 2018. Fitness, competitive ability, and mutation stability of isolates of *Colletotrichum acutatum* from strawberry resistant to Qo1 fungicides. Phytopathology 108:462–468.
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). 2020. FRAC code list 2020: fungal control agents sorted by cross resistance patterns and mode of action. Online: <https://www.frac.info/knowledge-database/knowledge-database>
- Freeman, S., Z. Shalev, and J. Katan. 2002. Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry. Plant Dis. 86:965–970.
- Fu, M., P. W. Crous, Q. Bai, P. F. Zhang, J. Xiang, et al. 2019. *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Pyrus* spp. in China. Persoonia 42:1–35.
- Fuentes-Aragón, D., S. B. Juárez-Vázquez, M. Vargas-Hernández, and H. V. Silva-Rojas. 2018. *Colletotrichum fructicola*, a member of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato, is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. ‘Hass’. Mycobiology 46:92–100.
- Fuentes-Aragón, D., V. Guarnaccia, A. Rebollar-Alviter, S. B. Juárez-Vázquez, F. Aguirre-Ray, and H. V. Silva-Rojas. 2020. Multilocus identification and thiophanate-methyl sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex associated with fruit with symptoms and symptomless leaves of mango. Plant Pathol. 69:1125–1138.
- Fujisawa, T., and T. Barraclough. 2013. Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed Yule coalescent approach: a revised method and evolution on simulated data sets. Syst. Biol. 62:707–724.
- Galindo-Tovar, M. E., N. Ogata-Aguilar, and A. M. Arzate-Fernández. 2008. Some aspects of avocado (*Persea americana* Mill.) diversity and domestication in Mesoamerica. Genet. Resour. Crop Evol. 55:441–450.

- Häberli, C. 2019. Please make avocado sustainable again. International Affairs Forum: food and water security. Pp. 44–47.
- Hacquard, S., B. Kracher, K. Hiruma, P. C. Münch, R. Garrido-Oter, *et al.* 2016. Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat. Comm.* 6:11362.
- Han, Y. C., X. G. Zeng, F. Y. Xiang, Q. H. Zhang, C. Guo, *et al.* 2018. Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. *J. Integr. Agric.* 17:1391–1400.
- Hartill, W. F. T. 1991. Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.* 19:297–304.
- Hassan, O., Y. S. Lee, and T. Chang. 2019. *Colletotrichum* species associated with Japanese plum (*Prunus salicina*) anthracnose in South Korea. *Sci. Rep.* 9:12089.
- Hawksworth, D. L., and R. Lücking. 2018. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 millions species. In: *The Fungal Kingdom*. Heitman, J., P. W. Crous, N. A. R. Gow, B. J. Howlett, T. Y. James, and E. H. Stukenbrock (Eds.). ASM Press USA. Pp: 79–96.
- Hernández-Lauzardo, A. N., A. Campos-Martínez, M. G. Velázquez-del Valle, H. E. Flores-Moctezuma, R. Suárez-Rodríguez, and J. A. Ramírez-Trujillo. 2015. First report of *Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on avocado in Mexico. *Plant Dis.* 99:555.
- Hou, L. W., F. Liu, W. J. Duan, and L. Cai. 2016. *Colletotrichum aracearum* and *C. camelliae-japonicae*, two holomorphic new species from China and Japan. *Mycosphere* 7:1111–1123.
- Hu, M. J., A. Grabke, M. E. Dowling, H. J. Holstein, and G. Schnabel. 2015. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. *Plant Dis.* 99:806–814.
- Hubka, V., V. Barrs, Z. Dudova, F. Sklenar, A. Kubatova, *et al.* 2018. Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*): opportunistic human and animal pathogens capable of interspecific hybridization. *Persoonia* 41:142–174.
- Hull, D. L. 1997. The ideal species concept-and why we can't get it. In: *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, London, United Kingdom. 357–380.
- Hyde, K. D., L. Cai, E. H. C. McKenzie, Y. L. Yang, J. Z. Zhang, and H. Prihastuti. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Divers.* 39:1–17.
- Jayawardena, R. S., K. D. Hyde, U. Damm, L. Cai, M. Liu, X. H. Li, *et al.* 2016. Notes of currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7:1192–1260.
- Juárez-Vázquez, S. B., H. V. Silva-Rojas, A. Rebollar-Alviter, M. Maidana-Ojeda, M. Osnaya-González, and D. Fuentes-Aragón. 2019. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum godetiae*, a novel pathogen causing anthracnose on loquat fruits (*Eryobryta japonica*). *J. Plant Dis. Prot.* 126:593–598.

- Kapli, P., S. Lutteropp, J. Zhang, K. Kobert, P. Pavlidis, A. Stamatakis, and T. Flouri. 2017. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics* 33:1630–1638.
- Kojima, K., Y. S. Bahn, and J. Heitman. 2006. *Calcinerium*, *Mpk1* and *Hog1* MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 152:591–604.
- Laurence, M. H., B. A. Summerell, L. W. Burgess, and E. C. Liew. 2014. Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biol.* 118:374–384.
- Leandro, L. F. S., M. L. Gleason, F. W. Nutter, S. N. Wegulo, and P. M. Dixon. 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology* 91:659–664.
- Leavitt, S. D., C. S. Moreau, and H. T. Lumbsch. 2015. The dynamic discipline of species delimitation: progress toward effectively recognizing species boundaries in natural populations. In: Recent Advances in Lichenology. Springer. India. pp: 11–44.
- Lemey, P., M. Salemi, and A. M. Vandamme. 2009. The phylogenetic handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. Second Edition. Cambridge University Press. New York, USA. 723 p.
- Li, X., D. Fernández-Ortuño, A. Grabke, and G. Schnabel. 2014. Resistance to fludioxonil in *Botrytis cinerea* isolates from blackberry and strawberry. *Phytopathology* 104:724–732.
- Liang, S., X. Xu, and Z. Lu. 2018. Effect of azoxystrobin fungicide on the physiological and biochemical indices and ginsenoside contents of ginseng leaves. *J. Ginseng Res.* 42:175–182.
- Liberato, J. R., and R. W. Barreto. 2006. *Oidium perseae-americanae* sp. nov. on avocado. *Mycotaxon* 98:189–192.
- Lin, T., X. F. Xu, D. J. Dai, H. J. Shi, H. D. Wang, and C. Q. Zhang. 2016. Differentiation in development of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* complex populations from strawberry and grape hosts. *Austral. Plant Pathol.* 45:241–249.
- Lisboa, D. O., M. A. Silva, D. B. Pinho, O. L. Pereira, and G. Q. Furtado. 2018. Diversity of pathogenic and endophytic *Colletotrichum* isolates from *Licania tomentosa* in Brazil. *Forest Pathol.* 48:e12448.
- Liu, F., B. S. Weir, U. Damm, P. W. Crous, Y. Wang, B. Liu, M. Wang, M. Zhang, and L. Cai. 2015. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia* 35:63–86.
- Liu, F., M. Wang, U. Damm, P. W. Crous, and L. Cai. 2016. Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. *BMC Evol. Biol.* 16:81.

- Liu, S., Y. Zhang, J. Jiang, Z. Che, Y. Tian, and G. Chen. 2018. Carbendazim resistance and dimethachlone sensitivity of field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in Henan Province, China. *J. Phytopathol.* 166:701–708.
- Liu, X., B. Li, J. Cai, X. Zheng, Y. Feng, and G. Huang. 2018. *Colletotrichum* species causing anthracnose of rubber trees in China. *Sci. Rep.* 8:10435.
- Liu, S., L. Fu, J. Chen, S. Wang, J. Jian, *et al.* Chen. 2019a. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to fluazinam and cross-resistance. *J. Phytopathol.* 167:344–350.
- Liu, S., J. Jiang, Z. Che, Y. Tian, and G. Chen. 2019b. Baseline sensitivity and control efficacy of fluazinam against *Sclerotinia sclerotiorum* in Henan Province, China. *J. Phytopathol.* 167:75–81.
- Lombard, L., M. Sandoval-Denis, S. C. Lamprecht, and P. W. Crous. 2019. Epitypification of *Fusarium oxysporum* – clearing the taxonomy chaos. *Persoonia* 43:1–47.
- Lucas, J. A., N. J. Hawkins, and B. A. Fraaije. 2015. The evolution of fungicide resistance. *Adv. Appl. Microbiol.* 90:29–92.
- Luchi, N., R. Ioos, and A. Santini. 2020. Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants. *Appl. Microbiol. Biot.* 104:2453–2468.
- Jurick II, W. M., O. Macarisin, V. L. Gaskins, E. Park, J. Yu, W. Janisiewicz, and K. A. Peter. 2017. Characterization of postharvest fungicide-resistance *Botrytis cinerea* isolates from commercially stored apple fruit. *Plant Dis.* 107:362–368.
- Ma, Z., and T. J. Michailides. 2005. Advances in understanding molecular mechanism of fungicide resistance and molecular detection of resistance genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 24:853–863.
- Ma, X., S. Nontachaiyapoom, R. S. Jayawardena, K. D. Hyde, E. Gentekaki, *et al.* 2018. Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand. *MycoKeys* 43:23–57.
- Manamgoda, D. S., D. Udayanga, L. Cai, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2013. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Divers.* 61:107–115.
- Mangandi, J., N. A. Peres, and V. M. Whitaker. 2015. Identifying resistance to crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in strawberry. *Plant Dis.* 99:954–961.
- Marais, L. J., 2004. Avocado diseases of major importance worldwide and their management. In: Diseases of Fruits and Vegetables: volume II. Naqvi SAMH (Ed.). Springer Science + Business Media Inc. USA. Pp: 1–36.
- Marin-Felix, Y., J. Z. Groenewald, L. Cai, Q. Chen, S. Marincowitz, *et al.* 2017. Genera of phytopathogen fungi: GOPHY 1. *Stud. Mycol.* 86:99–216.
- Markakis, E. A., N. Kavroulakis, and G. C. Koubouris. 2014. First report of *Verticillium* wilt caused by *Verticillium dahliae* on avocado trees in Greece. *Plant Dis.* 98: 1584.
- McDonald, V., and A. Eskalen. 2011. *Botryosphaeriaceae* species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Dis.* 95:1465–1473.

- McLennan, D. A. 2010. How to read a phylogenetic tree. *Evolution: Education and Outreach* 3:506–519.
- Mhameed, S., D. Sharon, D. Kaufman, E. Lahav, J. Hillel, C. Degani, and U. Lavi. 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. *Theor. Appl. Genet.* 94:279–286.
- Nair, J., F. J. Newhook, and J. B. Corbin. 1983. Survival of *Colletotrichum acutatum* f. sp. *pinea* in soil and pine debris. *Transactions of the British Mycological Society* 81: 53–63.
- Noel, Z. A., J. Wang, and M. I. Chilvers. 2018. Significant influence of CE50 estimation by model choice and EC50 type. *Plant Dis.* 102:708–714.
- Norman, S. J., and J. O. Strandberg. 1997. Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leatherleaf fern. *Plant Dis.* 81:1177–1180.
- O'Connell, R. J., M. R. Thon, S. Hacquard, S. G. Amyotte, J. Kleemann, et al. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44:1060–1067.
- Ochoa-Fuentes, Y. M., E. Cerna-Chavez, G. Gallegos-Morales, M. Cepeda-Siller, J. Landero-Flores, y A. Flores-Olivas. 2015. Variabilidad patogénica de *Phytophthora cinnamomi* Rands en *Persea americana* Mill. de Michoacán, México. *Ecosist. Rec. Agrop.* 2:211–215.
- Ploetz, R. C., S. A. Inch, J. M. Perez-Martinez, and T. L. White. 2012. Systematic infection of avocado, *Persea americana*, by *Raffaelea lauricola*, does not progress into fruit pulp or seed. *J. Phytopathol.* 160:491–495.
- Ploetz, R. C., J. L. Konkol, J. M. Pérez-Martínez, and R. Fernández. 2017. Management of laurel wilt of avocado, caused by *Raffaelea lauricola*. *Eur. J. Plant Pathol.* 419:133–143.
- Prusky, D., J. McEvoy, R. Leverenz, and W. Conway. 2007. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology* 9:1105–1113.
- Prusky, D., N. Alkan, T. Mengiste, and R. Fluhr. 2013. Quiescent and necrotrophic life style choice during postharvest disease development. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:155–176.
- Qiu, F., G. Xu, J. Zhou, F. Q. Zheng, L. Zheng, W. G. Miao, W. L. Wang, and C. P Xie. 2020. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing stem-end rot in avocado (*Persea americana*) in China. *Plant Dis.* 104:286.
- Ramdial, H., F. N. Hosein, and S. N. Rampersad. 2016. Detection and molecular characterization of benzimidazole resistance among *Colletotrichum truncatum* isolates infecting bell pepper in Trinidad. *Plant Dis.* 100:1146–1152.
- Ramírez-Gil, J. G., D. A. Castañeda-Sánchez, and J. G. Morales-Osorio. 2016. Production of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi* under different management regimes. *Plant Pathol.* 66:623–632.
- Rashmi, M., J. S. Kushveer, and V. V. Sarma. 2019. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. *Mycosphere* 10:798–1079.

- Rebollar-Alviter, A., H. V. Silva-Rojas, D. Fuentes-Aragón, U. Acosta-González, M. Martínez-Ruiz, and B. E. Parra-Robles. 2020. An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. Plant Dis. 104: In press.
- Ren, W., W. Shao, X. Han, M. Zhou, and C. Chen. 2016. Molecular and biochemical characterization of laboratory and field mutants of *Botrytis cinerea* resistant to fludioxonil. Plant Dis. 100:1414–1423.
- Ren, L., S. F. Wang, X. J. Shi, J. Y. Cao, J. B. Zhou, and X. J. Zhao. 2020. Characterisation and sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. capsici*, causing pepper anthracnose, to picoxystrobin. J. Plant Dis. Prot. 127: In press. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00316-y>
- Renner, S. 1999. Circumscription and phylogeny of Laurales: evidence from molecular and morphological data. Am. J. Bot. 86:1301–1315.
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Panorama Agroalimentario. 2020. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019. [Accessed 28 January 2020].
- Sandoval-Denis, M., V. Guarnaccia, G. Polizzi, and P. W. Crous. 2018. Symptomatic *Citrus* trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. Persoonia 40:1–25.
- Sandoval-Denis, M., L. Lombard, and P. W. Crous. 2019. Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. Persoonia 43:90–185.
- Santos, R. F., M. Ciampi-Guillardi, L. Amorim, N. S. Massola Júnior, and M. B. Spósito. 2018a. Aetiology of anthracnose on grapevine shoots in Brazil. Plant Pathol. 67: 692–706.
- Santos, R. F., M. B. Spósito, M. Ayres, and M. Sosnowski. 2018b. *In vitro* production of conidia of *Elsinoë ampelina*, the causal fungus of grapevine anthracnose. Eur. J. Plant Pathol. 152:815–821.
- Sanz-Martin, J. M., V. Postigo, A. Mateos, B. Albrecht, G. P. Munkvold, et al. 2016. First report of *Colletotrichum graminicola* causing maize anthracnose stalk rot in the Alentejo region, Portugal. Plant Dis. 100:648.
- Saucedo-Carabez, J. R., D. Téliz-Ortíz, S. Ochoa-Asencio, D. Ochoa-Martínez, M. R. Vallejo-Pérez, and H. Beltrán-Peña. 2014. Effect of Avocado sunblotch viroid (ASBVd) on avocado yield in Michoacán, Mexico. Eur J Plant Pathol. 138:799–805.
- Sharma, G., M. Maymon, and S. Freeman. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. Sci. Rep. 7:15839.
- Siahaan, S. A. S., I. Hidayat, K. Kramadibrata, J. Meeboon, and S. Takamtsu. 2016. *Podosphaera persea-americanae*, a new powdery mildew species on *Persea americana* (avocado) from Indonesia. Mycoscience 57:417–421.
- Sierotzki, H., J. Wullschleger, and U. Gisi. 2000. Point-mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. Pestic. Biochem. Physiol. 68:107–112.

- Sierotzki, H. 2015. Respiration inhibitors: complex III. In: Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a guide to practical management. Ishii H, Hollomon DW (Eds.). Springer. Japan. Pp: 119–144.
- Silva, L. L., H. L. A. Moreno, H. L. N. Correia, M .F. Santana, and M. V. Queiroz. 2020. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. Appl. Microbiol. Biotechnol. 104:1891–1904.
- Silva-Rojas, H. V., and G. D. Ávila-Quezada. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. Plant Pathol. 60:899–908.
- Sklenar, F., Z. Jurjevic, S. W. Peterson, M. Kolarik, A. Novakova, *et al.* 2020. Increasing the species diversity in the *Aspergillus* section *Nidulantes*: six novel species mainly from the indoor environment. Mycologia 112:342–370.
- Stenzel, K., and J. P. Vors. 2019. Sterol biosynthesis inhibitors. In: Modern crop protection compounds. Third edition. P. Jeschke, M. Witschel, Kramer W, U. Schirmer (Eds.). WILEY-VCH. Weinheim, Germany. Pp: 797–844.
- Storey, W. B., B. Bergh, and G. A. Zentmyer. 1986. The origin, indigenous range, and dissemination of the avocado. California Avo. Soc. Yearbook 70:127–133.
- Sulewska, H., K. Ratajczak, K. Panasiewicz, and H. M. Kalaji. 2019. Can pyraclostrobin and epoxiconazole protect conventional and stay –green maize varieties grown under drought stress. PLoS ONE 14:e0221116.
- Tao, G., Z. Y. Liu, F. Liu, Y. H. Gao, and L. Cai. 2013. Endophytic *Colletotrichum* species from *Betelia ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new species. Fungal Divers. 61:139–164.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., *et al.* 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. Fungal Genet. Biol. 31:21–32.
- Torres-Calzada, C., R. Tapia-Russel, I. Higuera-Ciapara, R. Martin-Mex, A. Nexticapan-Garcez, and D. Perez-Brito. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. Plant Dis. 99:1590–1595.
- Tovar-Pedraza, J. M., J. A. Mora-Aguilera, C. Nava-Díaz, N. B. Lima, S. J. Michereff, *et al.* 2020. Distribution and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Mexico. Plant Dis. 104:137–146.
- Twizeyimana, M., H. Förster, V. McDonal, D. H. Wang, J. E. Adaskaveg, and A. Eskalen. 2013. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. Plant Dis. 97:1580–1584.
- Valencia, A. L., P. M. Gil, B. A. Latorre, and I. M. Rosales. 2019. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species obtained from avocado trees with branch canker and dieback and from avocado fruit with stem end rot in Chile. Plant Dis. 103:996–1005.
- Van Kan, J. A. 2006. Licensed to kill: the life style of a necrotrophic plant pathogen. Trends Plant Sci. 11:247–253.

- Vasconcelos, C. V., F. T. Pereira, C. S. Galvão, and D. D. C. Carvalho. 2016. Ocurrence of algal leaf spot (*Cephaleuros virescens* Kunze) on avocado in Goiás State, Brazil. *Summa Phytopathol.* 42:108.
- Velázquez-del Valle, M. G., A. Campos-Martínez, H. E. Flores-Moctezuma, R. Suárez-Rodríguez, J. A. Ramírez-Trujillo, and A. N. Hernández-Lauzardo. 2016. First report of avocado anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. *Plant Dis.* 100:534.
- Vieira, W. A. S., S. J. Michereff, M. A. de Moraes Jr, K. D. Hyde, and M. P. S. Câmara. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Divers.* 67:181–202.
- Vieira, W. A. S., W. G. Lima, E. S. Nascimento, S. J. Michereff, A. Reis, *et al.* 2017. Thiophanate-methyl resistance and fitness components of *Colletotrichum musae* isolates from banana in Brazil. *Plant Dis.* 101:1659–1665.
- Vieira, W. A. S., P. A. Bezerra, A. C. Silva, J. S. Veloso, M. P. S. Câmara, and V. P. Doyle. 2020. Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 143:106694.
- Vrisman, C. M., A. L. Testen, F. Elahi, and S. A. Miller. 2017. First report of tomato brown root rot complex caused by *Colletotrichum coccodes* and *Pyrenopeziza lycopersici* in Ohio. *Plant Dis.* 101:247.
- Wang, Y. C., X. Y. Hao, L. Wang, B. Xiao, X. C. Wang, and Y. J. Yang. 2016. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. *Sci. Rep.* 6:35287.
- Wei, L. L., W. C. Chen, W. C. Zhao, *et al.* 2020. Mutations and overexpression of *CYP51* associated with DMI-resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from chili. *Plant Dis.* 104:668–676.
- Wijayawardene, N. N., K. D. Hyde, K. C. Rajeshkumar, D. L. Hawksworth, H. Madrid, *et al.* 2017. Notes for genera: *Ascomycota*. *Fungal Divers.* 86:1–594.
- Wu, Y. X., and A. Tiedemann. 2001. Physiological effects of azoxystrobin and epoxiconazole on senescence and the oxidative status of wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71:1–10.
- Xu, X. F., T. Lin, S. K. Yuan, D. J. Dai, H. J. Shi, C. Q. Zhang, and H. D. Wang. 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. *Australas. Plant Pathol.* 43:605–613.
- Yokosawa, S., N. Eguchi, and T. Sato. 2020. Characterization of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing grape ripe rot in Nagano Prefecture, Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 86:163–172.
- Young, J. R., M. Tomaso-Peterson, K. Cerda, and F. P. Wong. 2010. Two mutations in β-tubulin 2 gene associated with thiophanate-methyl resistance in *Colletotrichum cereal* isolates from creeping bentgrass in Mississippi and Alabama. *Plant Dis.* 94:207–212.

- Young, D. Y. 2015. Anti-tubulin agents. In: Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a guide to practical management. Ishii H, Hollomon DW (Eds.). SPRINGER. Japan. Pp: 93–104.
- Zhang, C., Y. Diao, W. Wang, J. Hao, M. Imran, and H. Duan. 2017. Assessing the risk for resistance and elucidating the genetics of *Colletotrichum truncatum* that is only sensitivity to some DMI fungicides. *Front. Microbiol.* 8:1779.
- Zhao, P., F. Liu, Y. M. Li, and L. Cai. 2016. Inferring phylogeny and speciation of *Gymnosporangium* species and their coevolution with host plants. *Sci. Rep.* 6:29339.
- Zhou, F., F. Lu, C. Zhang, H. X. Qi, X. D. Wang, and G. Z. Zhang. 2017. Ocurrence of fenhexamid resistance in *Botrytis cinerea* from greenhouse strawberries in China. *J. Phytopathol.* 165:455–462.
- Zhou, S., L. Qiao, R. S. Jayawardena, K. D. Hyde, X. Ma, T. Wen, and J. Kang. Two new endophytic *Colletotrichum* species from *Nothapodytes pittosporoides* in China. *MycoKeys* 49:1–14.

CAPÍTULO I. ESPECIES DE *Colletotrichum* ASOCIADAS A LA ANTRACNOSIS DEL AGUACATE EN MÉXICO

1.1 RESUMEN

Colletotrichum spp. causa antracnosis en cultivos tropicales y subtropicales alrededor del mundo. México es el principal productor y exportador de aguacate; sin embargo, las especies de *Colletotrichum* causando epidemias de antracnosis no es clara. Este estudio tuvo como objetivo identificar las especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en frutos de aguacate y determinar su patogenicidad. Se obtuvieron 232 aislamientos de seis regiones productoras, donde un subconjunto de 104 aislamientos se seleccionó con base en las características culturales y morfológicas y el origen. Este subconjunto se secuenció y se analizó en haplotipos usando el gen parcial de *gapdh*. Finalmente, 31 cepas se identificaron a través de análisis filogenético multilocus (ITS, *gapdh*, *act*, *chs-1*, *tub2*, *his3*, *gs*, and *ApMat*). Este estudio reveló la presencia de dos especies previamente reportadas en México (*C. karsti* y *C. godetiae*), tres nuevos reportes en México (*C. siamense*, *C. fioriniae*, y *C. cigarro*), cuatro nuevos reportes en el mundo asociados al aguacate (*C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. nymphaeae*, y *C. tropicale*) y dos nuevos linajes, llamados aquí como *Colletotrichum* sp. 1 y *Colletotrichum* sp. 2. *C. siamense* fue el más prevalente, mientras que las especies reportadas por primera vez en aguacate fueron las menos prevalentes, incluyendo los nuevos linajes. *C. karsti* fue la de mayor distribución (cuatro regiones), seguida por *C. siamense*, *C. jiangxiense* y *C. chrysophilum* (tres regiones). Las pruebas de patogenicidad mostraron que todas las especies produjeron síntomas de antracnosis en frutos de aguacate. Estos resultados serán útiles para mejorar el manejo de las epidemias de antracnosis en aguacate en México.

Palabras clave: Análisis filogenético multilocus, *Persea americana*, complejo de especies

1.2 ABSTRACT

Colletotrichum species causes anthracnose diseases on tropical and subtropical fruit crops worldwide. Avocado represents one of the most important fruit for Mexico; because it is the main producer and exporter around the world. Nevertheless, *Colletotrichum* spp. causing anthracnose outbreaks on avocado producing-regions remain unclear. Thus, the objective of the present study was to identify the *Colletotrichum* spp. responsible for anthracnose on avocado fruit. A survey performed in six producing-regions yielded 232 isolates, from which a subset of 104 isolates was selected, according to morphological characteristics and their origin. This subset was sequenced and haplotype analysed in the *gapdh* partial gene. Finally, thirty-one strains were identified through multilocus phylogenetic analyses using the concatenated sequences of ITS region and six loci. This study revealed the presence of two species previously reported in México (*C. karsti* and *C. godetiae*), three novel records in México (*C. siamense*, *C. fioriniae*, and *C. cigarro*), four novel records in the world (*C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. nymphaeae*, and *C. tropicale*) and two novel lineages, namely here as *Colletotrichum* sp. 1 and *Colletotrichum* sp. 2. *C. siamense* was the most prevalent, while the species reported for the first time on avocado including the novel lineages were the less. *C. karsti* was the most distributed (four regions), followed by *C. siamense*, *C. jiangxiense*, and *C. chrysophilum* (three regions). Pathogenicity assays showed that all species displayed anthracnose symptoms on avocado fruit. These findings will be useful to improve the management of the anthracnose outbreaks on avocado in Mexico.

Keywords: Multilocus phylogenetic analysis, *Persea americana*, species complexes.

1.3 INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) ha sido la fruta cultivada más importante por muchos siglos en México, de dónde se ha distribuido a otros lugares del mundo. Históricamente, México se ha considerado el centro de origen del aguacate por las poblaciones silvestres encontradas en la parte central del país (Smith, 1996). El incremento en el área plantada que comenzó en el último medio siglo, posicionó al país como el líder en producción y exportación en el mundo. Los cultivares Hass, Méndez y Fuerte son los más cultivados en México, donde ‘Hass’ representa el 95 % de la producción total nacional; la cual, en 2018 fue de 2.18 millones de toneladas, donde el estado de Michoacán produjo 76.6% del total (SADER, 2020). El 50% de la producción se exporta a los Estados Unidos de Norteamérica, Japón, Canadá, España, Francia, Países Bajos, Reino Unido, El Salvador, China y Honduras, con un ingreso estimado de 2,704 millones de dólares (SADER, 2020).

La planta de aguacate tiene que enfrentar el ataque de diversos fitopatógenos, incluyendo a hongos como *Colletotrichum* spp., *Armillaria* spp., *Pseudocercospora* sp., *Dothiorella* spp., *Botryosphaeria* spp., *Neocosmospora perseae*, *Raffaelea lauricola* y *Sphaceloma perseae*, los cuales causan severos daños a raíces, hojas, frutos, ramas y troncos (Dann *et al.*, 2013).

El género *Colletotrichum* estuvo clasificado en el top 10 en hongos fitopatógenos del mundo debido a su importancia económica y científica (Dean *et al.*, 2012), incluyendo un gran número de especies agrupadas dentro de complejos. Recientemente, especies de *Colletotrichum* se reclasificaron usando análisis filogenético multilocus, dando surgimiento a complejos de especies que pueden infectar importantes cultivos en todo el mundo (Weir *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012a, b). Los marcadores moleculares utilizados en el análisis filogenético son más relevantes dependiendo del complejo de especies de *Colletotrichum*. La glutamina sintetasa y el espacio intergénico entre los genes Apn2-MAT1-2 y MAT1-2

resuelven la delimitación del complejo *C. gloeosporioides* (Liu *et al.*, 2015). Sin embargo, un enfoque polifásico, incluyendo métodos de delimitación de especies, debe ser usado en especies con alto polimorfismos y morfotipos. Por ejemplo, *C. siamense* se propuso como un nuevo complejo de especies (CE) conformado por ocho especies mediante análisis filogenético multilocus (Sharma *et al.*, 2015) o un solo locus con *ApMat* (Sharma *et al.*, 2013). Liu *et al.* (2016) demostró, usando el reconocimiento de especies mediante la Concordancia Genealógica Filogenética (GCPSR) y métodos coalescentes que, *C. siamense* no es un complejo de especies. La GCPSR compara más de una genealogía del gen para establecer la concordancia de todos los árboles de especies (Taylor *et al.*, 2000). Este enfoque es ampliamente usado y aceptado para detectar recombinación genética entre especies cercanas y resolver los límites en diversas especies nuevas de *Colletotrichum* (Liu *et al.* 2015; Wang *et al.*, 2016; Diao *et al.*, 2017).

Las especies de *Colletotrichum* que se han asociado a la antracnosis del aguacate en el mundo son: *C. aenigma*, *C. alienum*, *C. fioriniae*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides s. s.*, *C. godetiae*, *C. cigarro*, *C. karsti*, *C. siamense*, *C. nupharicola*, *C. perseae* y *C. theobromicola* (Weir *et al.*, 2012; Guarnaccia *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017). Mientras que, en México, las especies reportadas son: *C. fructicola*, *C. godetiae*, *C. karsti*, *C. acutatum s. l.*, *C. boninense s.l* y *C. gloeosporioides s.l.* (Silva-Rojas and Ávila-Quezada, 2011; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015; Velázquez-del Valle *et al.*, 2016; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018). En México, la antracnosis aparece en cada ciclo de producción durante el desarrollo del fruto, principalmente en lugares donde prevalecen alta humedad relativa y temperatura. Los síntomas iniciales aparecen en el exocarpio, mostrando pequeñas manchas negras (<1 mm), con el tiempo, se vuelven más grandes y hundidas. En el caso de alta incidencia, se ha observado la caída de los frutos en etapas tempranas de desarrollo. Por otra

parte, cuando los síntomas aparecen en frutos más grandes, se reduce la calidad y se desechan.

El conocimiento de la diversidad de las especies de *Colletotrichum* asociadas con un hospedante es crucial para la implementación de estrategias eficientes de manejo, debido a que unas especies muestran una mejor aptitud patogénica que otras y esta característica puede ser mejorada por diversos factores como alta o inherente resistencia a fungicidas (Chen *et al.*, 2018; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020), desarrollo de la fase sexual, la cual es epidemiológicamente importante por la recombinación genética (De Silva *et al.*, 2017), y la virulencia (Sharma *et al.*, 2017; De Silva *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020). El monitoreo de patógenos cuarentenados requiere una identificación precisa para evitar la diseminación. Sin embargo, se ha estudiado muy poco la diversidad y distribución de especies de *Colletotrichum* causando síntomas de antracnosis en frutos de aguacate en México. El presente estudio tuvo como objetivo la identificación filogenética, caracterización morfológica, distribución y patogenicidad de especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en frutos de aguacate, colectados en las principales regiones productoras de México.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Muestreo y aislamiento

Durante 2017-2018 se colectaron frutos de aguacate con síntomas de antracnosis en las principales regiones productoras (Michoacán, Nayarit, Morelos, Puebla, Guerrero y Oaxaca) en México. Se cortaron tejidos del exocarpo mostrando lesiones necróticas hundidas y se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 min, y se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada. Después, pequeñas porciones de tejido se colocaron en medio de

cultivo malta extracto agar y se incubaron a 25 °C en oscuridad, hasta que se observó el crecimiento de micelio y masas de conidios típicos de *Colletotrichum*. Cultivos puros se obtuvieron de conidios individuales en agua agar, incubados a 25 °C por 24 h. Posteriormente, se transfirieron en medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 25 °C con un fotoperiodo de 12 h oscuridad/luz fluorescente por 5 días. Todos los aislamientos se conservaron en glicerol al 30 % a -80 °C para su posterior caracterización cultural, morfológica y molecular.

1.4.2 Extracción de DNA, PCR y secuenciación

Se extrajo el DNA de 104 cepas, previamente seleccionadas con base en las características culturales y morfológicas, usando el método del CTAB al 2 % (Doyle y Doyle, 1990) con ligeras modificaciones. El gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se secuenció usando los oligos GDF1 y GDR1 (Guerber et al., 2003). Posteriormente, se seleccionaron y secuenciaron diferentes haplotipos en la región ITS (ITS), quitina sintetasa 1 (*chs-1*), betatubulina (*tub2*) e histona 3 (*his3*) usando los oligos descritos en el Cuadro 1. Además, se incluyeron a la glutamina sintetasa (*gs*) y la región intergénica entre los genes Apn2-MAT1-2 y MAT1-2 (*ApMat*) para las especies pertenecientes a *C. gloeosporioides* CE. Las condiciones de temperatura de la PCR para el *gapdh*, ITS, *act* y *chs-1* se llevaron a cabo según Fuentes-Aragón et al. (2018) y para el *ApMat*, de acuerdo a Silva et al. (2012). Las condiciones de PCR para la *gs* fueron un primer paso de desnaturación a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 61 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min; para la *tub2* se usaron las mismas condiciones a excepción de la temperatura de alineamiento que se ajustó a 55 °C. Todos los productos de PCR se purificaron con ExoSAP-IT (Affymetrix, EUA) y se secuenciaron directamente en un secuenciador Genetic Analyser 3130 (Applied Biosystems, EUA) en el Colegio de

Postgraduados, como se describió por Juárez-Vázquez *et al.* (2019), a excepción del *gapdh* que se secuenció en Macrogen (Maryland, EUA).

Cuadro 1. Oligos utilizados en este estudio para la amplificación y secuenciación de 8 regiones génicas

Gen	Producto	Oligo	Dirección	Sequence 5'-3'	Referencia
ITS	Espacio Trancrito Interno	ITS5	Forward	GGAAGTAAAAGTCGTAAC AAGG	White <i>et al.</i> (1990)
		ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATG C	White <i>et al.</i> (1990)
	Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa	GDF1	Forward	GCCGTCAACGACCCCTTCA TTGA	Templeton <i>et al.</i> (1992)
		GDR1	Reverse	GGGTGGAGTCGTACTTGA GCATGT	Templeton <i>et al.</i> (1992)
<i>act</i>	Actina	ACT-512F	Forward	ATGTGCAAGGCCGGTTTC GC	Carbone y Kohn (1999)
		ACT-783R	Reverse	TACGAGTCCTCTGGCCA T	Carbone y Kohn (1999)
	Quitina sintetasa	CHS-79F	Forward	TGGGGCAAGGATGCTTGG AAGAAG	Carbone y Kohn (1999)
		CHS-354R	Reverse	TGGAAGAACCATCTGTGA GAGTTG	Carbone y Kohn (1999)
<i>tub2</i>	β -tubulina	T1	Forward	AACATCGCTGAGATTGTA AGT	O'Donnell y Cigelnik (1997)
		Bt2b	Reverse	ACCCTCAGTGTAGTGACCC TTGGC	Glass y Donaldson (1995)
	Histona 3	CYLH3F	Forward	AGGTCCACTGGTGGCAAG AGCTGGATGTCCTTGGACT	Crous <i>et al.</i> (2004)
		CYLH3R	Reverse	G	Crous <i>et al.</i> (2004)
<i>gs</i>	Glutamina sintetasa	GSF1	Forward	ATGGCCGAGTACATCTGG	Stephenson <i>et al.</i> (1997)
		GSR1	Reverse	GAACCGTCGAAGTTCCAG	Stephenson <i>et al.</i> (1997)
	Espacio intergénico entre los genes <i>Apn2-Mat1-2</i> y <i>Mat1-2</i>	AMF1	Forward	CCAGAAATACACCGAACT TGC	Silva <i>et al.</i> (2012)
		AMR1	Reverse	TCATTCTACGTATGTGCC G	Silva <i>et al.</i> (2012)

1.4.3 Diversidad de haplotipos

Se estimó el número de haplotipos usando DnaSP v6 (Rozas *et al.*, 2017), y se reconstruyó la red de haplotipos con el software PopART (Leigh y Bryant, 2015), usando 104 secuencias

parciales del *gapdh*. El algoritmo Templeton, Crandall y Sing (TCS), se utilizó para la reconstrucción de la red, la cual se aplicó para seleccionar haplotipos y lugares de muestreo para los análisis filogenéticos multilocus. Para cada secuencia de DNA, se implementó una búsqueda de BLAST en la base de datos del GenBank (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la asignación del complejo de especie al que pertenecen.

1.4.4 Análisis filogenéticos multilocus

Se obtuvieron secuencias consenso del forward y reverse de cada cepa usando el programa Geneious v.11.1.5 (Kearse et al., 2012). Posteriormente, se llevaron a cabo alineamientos múltiples para cada gen o región mediante MAFFT v.7 (Katoh y Standley, 2013) con los parámetros establecidos por defecto. Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo para cada complejo de especies detectado mediante el análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se incluyeron 14 secuencias pertenecientes a *C. gloeosporioides* CE, 6 de *C. boninense* CE, 8 de *C. acutatum* CE y 3 de *C. magnum* CE. Además, se incluyeron secuencias de referencia seleccionadas en recientes estudios (Damm et al., 2012a, b, Weir et al., 2012, Damm et al., 2019) (Cuadro 2). Los análisis filogenéticos se realizaron con los métodos de Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB). Para la IB se seleccionaron los mejores modelos evolutivos con MrModelTest v. 2.3 (Nylander, 2004) y se incorporaron en el análisis. El programa MrBayes v. 3.2.5 (Ronquist et al., 2012) se utilizó para generar árboles filogenéticos bajo criterios óptimos para cada partición. El análisis de las Cadenas de Markov Monte Carlo usó cuatro cadenas e inició con una topología del árbol al azar. El parámetro de calentamiento se fijó en 0.2 y los árboles se muestrearon cada 1000 generaciones. El análisis se detuvo una vez que las desviaciones estándar de los ‘splits’ alcanzaron un valor menor a 0.01. El análisis con MP se realizó usando PAUP (Swofford,

2003). Las relaciones filogenéticas se estimaron mediante búsquedas heurísticas con 100 secuencias adicionadas al azar. Se usó el método de ‘disección-reconexión’, con la opción de intercambio de ramas establecida en ‘los mejores árboles’ solamente con todos los caracteres igualmente ponderados y los ‘gaps’ en los alineamientos se consideraron como quinto estado. Además, se calculó la longitud del árbol (TL), el índice de consistencia (CI), índice de retención (RI) y el índice de consistencia reescalado (RI) para la parsimonia, y el análisis de remuestreo (bootstrap) se basó en 1000 repeticiones.

1.4.5 Reconocimiento de especies a través de la Concordancia Genealógica Filogenética

La prueba del Índice de Homoplasia por Pares (IHP) se calculó para los nuevos linajes, de acuerdo a Quaedvlieg et al. (2014), usando conjuntos de datos concatenados con SplitsTree4 (Huson y Bryant, 2006). Para *C. boninense* CE y *C. magnum* CE se usaron seis loci concatenados (ITS, *gapdh*, *chs-1*, *act*, *tub2*, and *his3*). Esta prueba se basa en la detección de recombinación genética de los clados cercanos y los nuevos linajes. Un valor de IHP menor a 0.05 indica presencia de recombinación ($\phi_w < 0.05$), por lo tanto, se establece que los clados evaluados pertenecen a diferentes especies.

Cuadro 2. Cepas de los complejos de *Colletotrichum* usadas en la reconstrucción filogenética con datos del hospedante, origen y números de accesión de GenBank.

Especie	Cepa	Hospedante	País	Número de accesión del GenBank							
				ITS	gapdh	chs-1	act	tub2	his3	gs	ApMat
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> complejo de especies											
<i>C. aenigma</i>	ICMP 18608*	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX010044	JX009774	JX009443	JX010389	-----	JX010078	KM360143
<i>C. aeschynomenes</i>	ICMP 17673*, ATCC 201874	<i>Aeschynomene virginica</i>	EUA	JX010176	JX009930	JX009799	JX009483	JX010392	-----	JX010081	KM360145
<i>C. alatae</i>	CBS 304.67, ICMP 17919*	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX010190	JX009990	JX009837	JX009471	JX010383	-----	JX010065	KC888932
<i>C. alienum</i>	ICMP 12071*	<i>Malus domestica</i>	Nueva Zelanda	JX010251	JX010028	JX009882	JX009572	JX010411	-----	JX010101	KM360144
	LC3114, LF322	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955131	KJ954832	-----	KJ954411	KJ955279	-----	KJ954982	KJ954545
<i>C. aotearoa</i>	ICMP 18537*	<i>Coprosma</i> sp.	Nueva Zelanda	JX010205	JX010005	JX009853	JX009564	JX010420	-----	JX010113	KC888930
<i>C. asianum</i>	CBS 130418, ICMP 18580*	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	FJ972612	JX010053	JX009867	JX009584	JX010406	-----	JX010096	FR718814
	ICMP 18696, IMI 313839	<i>Mangifera indica</i>	Australia	JX010192	JX009915	JX009753	JX009576	JX010384	-----	JX010073	-----
	MTCC 11680, GM595	<i>Mangifera indica</i>	India	JQ894679	JQ894623	JQ894616	JQ894545	JQ894601	-----	-----	JQ894554
<i>C. camelliae</i>	CGMCC 3.14925, LC1364*	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955081	KJ954782	-----	KJ954363	KJ955230	-----	KJ954932	KJ954497
	LF170, LC2962	<i>Camellia</i> sp.	China	KJ955091	KJ954792	-----	KJ954373	KJ955240	-----	KJ954942	KJ954507
<i>C. clidemiae</i>	ICMP 18706*	<i>Clidemia hirta</i>	EUA	JX010265	JX009989	JX009877	JX009537	JX010438	-----	JX010129	KC888929
<i>C. conoides</i>	CAUG17*	<i>Capsicum annuum</i>	China	KP890168	KP890162	KP890156	KP890144	KP890174	-----	-----	-----
	CAUG33	<i>Capsicum annuum</i>	China	KP890169	KP890163	KP890157	KP890145	KP890175	-----	-----	-----
<i>C. cordylinicola</i>	ICMP 18579, LC0886*	<i>Cordyline fruticosa</i>	Tailandia	JX010226	JX009975	JX009864	HM470235	JX010440	-----	JX010122	JQ899274
<i>C. chrysophilum</i>	URMT368, CMM 4268*	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KX094252	KX094183	KX094083	KX093982	KX094285	-----	KX094204	KX094325
	CMM4363	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KX094240	KX094180	KX094071	KX093962	KX094283	-----	KX094201	KX094323
	CMM4309	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KX094255	KX094185	KX094086	KX093984	KX094287	-----	KX094206	KX094327

	CPO 27.408	<i>Persea americana</i>	México	MN744284	MN737343	MN746551	MN746518	MN848364	-----	MN848394	MN854411
	CPO 27.709	<i>Persea americana</i>	México	MN744285	MN737344	MN746552	MN746519	MN848365	-----	MN848395	MN854412
	CPO 27.845	<i>Persea americana</i>	México	MN744286	MN737345	MN746553	MN746520	MN848366	-----	MN848396	-----
<i>C. endophytica</i>	CAUG28	<i>Capsicum annuum</i>	China	KP145441	KP145413	KP145385	KP145329	KP145469	-----	-----	-----
<i>C. fructivorum</i>	CBS 133135, BPI 884114	<i>Rhexia virginica</i>	EUA	JX145133	-----	-----	-----	JX145184	-----	-----	JX145283
	CBS 133125, BPI 884103*	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	EUA	JX145145	-----	-----	-----	JX145196	-----	-----	JX145300
<i>C. fructicola</i>	CBS 130416, ICMP 18581*	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX010165	JX010033	JX009866	FJ907426	JX010405	-----	JX010095	JQ807838
	LC2923	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955083	KJ954784	-----	KJ954365	KJ955232	-----	KJ954934	KJ954499
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 112999, ICMP 17821*	<i>Citrus sinensis</i>	Italia	JX010152	JX010056	JX009818	JX009531	JX010445	-----	JX010085	JQ807843
	LC3110, LF318	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955127	KJ954828	-----	KJ954407	KJ955275	-----	KJ954978	KJ954541
	L3382, LF604	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955176	KJ954877	-----	KJ954450	KJ955323	-----	KJ955026	KJ954584
<i>C. grevilleae</i>	CBS 132879, CPC 15481*	<i>Grevillea</i> sp.	Italia	KC297078	KC297010	KC296987	KC296941	KC297102	-----	KC297033	-----
<i>C. grossum</i>	CGMCC 3.17614, CAUG7*	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP890165	KP890159	KP890153	KP890141	KP890171	-----	-----	MG826120
	CAUG32	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP890167	KP890161	KP890155	KP890143	KP890173	-----	-----	-----
<i>C. hebeiense</i>	JZB330024	<i>Vitis vinifera</i>	China	KF156873	KF377505	-----	KF377542	-----	-----	-----	-----
	MFLUCC 13 0726, JZB330028*	<i>Vitis vinifera</i>	China	KF156863	KF377495	KF289008	KF377532	KF288975	-----	-----	-----
<i>C. helleniense</i>	CBS 142418, CPC 26844*	<i>Poncirus trifoliata</i>	Grecia	KY856446	KY856270	KY856186	KY856019	KY856528	-----	-----	-----
	CBS 142419, CPC 27107	<i>Citrus reticulata</i>	Grecia	KY856447	KY856271	KY856187	KY856020	KY856529	-----	-----	-----
<i>C. henanense</i>	CGMCC 3.17354, LC3030*	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955109	KJ954810	-----	KM023257	KJ955257	-----	KJ954960	KJ954524
	LC2820, LF24	<i>Cirsium japonicum</i>	China	KM610182	KM610178	-----	KM610172	KM610184	-----	KM610180	KM610174
<i>C. horii</i>	ICMP 10492, MTCC 10841*	<i>Diospyros kaki</i>	Japón	GQ329690	GQ329681	JX009752	JX009438	JX010450	-----	JX010137	JQ807840

<i>C. jiangxiense</i>	ICMP 17968	<i>Diospyros kaki</i>	China	JX010212	GQ329682	-----	JX009547	JX010378	-----	JX010068	-----
	CGMCC 3.17363, LC3463*	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955201	KJ954902	-----	KJ954471	KJ955348	-----	KJ955051	KJ954607
	CGMCC 3.17361	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955149	KJ954850	-----	KJ954427	-----	-----	KJ955000	KJ954561
	CGMCC 3.17890, SC3A3	<i>Camellia sinensis</i>	China	KU251593	KU252047	KU251941	KU251674	KU252202	-----	KU252100	KU251730
	CPO 27.850	<i>Persea americana</i>	México	MN744287	MN737346	-----	MN746521	-----	-----	MN848397	MN854413
<i>C. cigarro</i>	CPO 27.905	<i>Persea americana</i>	México	MN744288	MN737347	MN746554	MN746522	MN848367	-----	MN848398	MN854414
	ICMP 18534*	<i>Olea europaea</i>	Australia	JX010230	JX009966	JX009800	JX009523	JX010434	-----	JX010132	-----
	CPO 27.894	<i>Persea americana</i>	México	MN744289	MN737348	-----	MN746523	MN848368	-----	MN848399	-----
<i>C. kahawae</i>	CPO 27.939	<i>Persea americana</i>	México	MN744290	MN737349	-----	MN746524	-----	-----	MN848400	MN854415
	ICMP 17816, IMI 319418*	<i>Coffea arabica</i>	Kenia	JX010231	JX010012	JX009813	JX009452	JX010444	-----	JX010130	JQ894579
<i>C. ledongense</i>	CGMCC 3.18888, LD1683*	<i>Hevea brasiliensis</i>	China	MG242009	MG242017	MG242019	MG242015	MG242011	-----	MG242021	-----
<i>C. musae</i>	CBS 116870, ICMP 19119*	<i>Musa</i> sp.	USA	JX010146	JX010050	JX009896	JX009433	HQ596280	-----	JX010103	KC888926
<i>C. nupharicola</i>	CBS 470.96, ICMP 118187*	<i>Nuphar lutea</i>	EUA	JX010187	JX009972	JX009835	JX009437	JX010398	-----	JX010088	JX145319
<i>C. perseae</i>	CBS 141365, GA100*	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620308	KX620242	-----	KX620145	KX620341	-----	KX620275	KX620177
	CBS 141366, GA272	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620321	KX620255	-----	KX620158	KX620354	-----	KX620287	KX620188
<i>C. proteae</i>	CBS 132882, CPC 14859*	<i>Protea</i> sp.	Sudáfrica	KC297079	KC297009	KC296986	KC296940	KC297101	-----	KC297032	-----
	CBS 134301, CPC 14860	<i>Protea</i> sp.	Sudáfrica	KC842385	KC842379	KC842377	KC842373	KC842387	-----	KC842387	-----
<i>C. psidii</i>	CBS 145.29, ICMP 19120*	<i>Psidium</i> sp.	Italia	JX010219	JX009967	JX009901	JX009515	JX010443	-----	JX010133	KC888931
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP 1778*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX010276	JX009934	JX009899	JX009447	JX010414	-----	JX010104	KC888928
	ICMP 12564	<i>Persea americana</i>	Australia	JX010184	JX009919	JX009759	JX009573	-----	-----	-----	-----

	ICMP 18705	<i>Coffea</i> sp.	Fiji	JX010185	JX010036	JX009890	JX009490	JX010412	-----	JX010102	-----
<i>C. rhexiae</i>	CBS 133132, BPI 884110	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	EUA	JX145157	-----	-----	-----	JX145209	-----	-----	JX145302
	CBS 133134, BPI 884112*	<i>Rhexia virginica</i>	EUA	JX145128	-----	-----	-----	JX145179	-----	-----	JX145290
<i>C. salsolae</i>	ICMP 19051*	<i>Salsola tragus</i>	Hungary	JX010242	JX009916	JX009863	JX009562	JX010403	-----	JX010093	KC888925
	CBS 119296, ICMP 18693	<i>Glycine max</i>	Hungary	JX010241	JX009917	JX009791	JX009559 J	-----	-----	-----	-----
<i>C. siamense</i>	CBS 130417, ICMP 18578*	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX010171	JX009924	JX009865	FJ907423	JX010404	-----	JX010094	JQ899289
	ICMP 12567	<i>Persea americana</i>	Australia	JX010250	JX009940	JX009761	JX009541	JX010387	-----	JX010076	-----
	MTCC 11672, GM018	<i>Mangifera indica</i>	India	JQ894653	JQ894624	JQ894608	JQ894533	JQ894594	-----	-----	-----
	LF182, LC2974	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ955093	KJ954794	-----	KJ954375	KJ955242	-----	KJ954944	KJ954509
	CPO 27.400	<i>Persea americana</i>	México	MN744291	MN737350	MN746555	MN746525	-----	-----	MN848401	MN854416
	CPO 27.415	<i>Persea americana</i>	México	MN744292	MN737351	-----	MN746526	-----	-----	MN848402	MN854417
	CPO 27.601	<i>Persea americana</i>	México	MN744293	MN737352	MN746556	MN746527	MN848369	-----	MN848403	MN854418
<i>C. syzygicola</i>	MFLUCC 100624*	<i>Syzygium samarangense</i>	China	KF242094	KF242156	-----	KF157801	KF254880	-----	KF242125	-----
<i>C. temperatum</i>	CBS 133120, BPI 884098	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	EUA	JX145135	-----	-----	-----	JX145186	-----	-----	JX145297
	CBS 133122, BPI 884100*	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	EUA	JX145159	-----	-----	-----	JX145211	-----	-----	JX145298
<i>C. theobromicola</i>	CBS 124945, ICMP 18649*	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010294	JX010006	JX009869	JX009444	JX010447	-----	JX010139	KC790726
	CBS 142.31, MTCC 10325	<i>Fragaria x ananassa</i>	EUA	JX010286	JX010024	JX009830	JX009516	JX010373	-----	JX010064	JQ807844
<i>C. ti</i>	ICMP 4832*	<i>Cordyline</i> sp.	Nueva Zelanda	JX010269	JX009952	JX009898	JX009520	JX010442	-----	JX010123	KM360146
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949, MTCC 11371*	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010264	JX010007	JX009870	JX009489	JX010407	-----	JX010097	KC790728
	CMM 4243	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KU213603	KU213601	KU213600	KU213596	KU213604	-----	KU213602	KU213597
	CPO 27.470	<i>Persea americana</i>	México	MN744294	MN737353	MN746557	MN746528	-----	-----	-----	-----
	CPO 27.477	<i>Persea americana</i>	México	MN744295	MN737354	-----	MN746529	-----	-----	MN848404	MN854419

	CPO 27.830	<i>Persea americana</i>	México	MN744296	MN737356	MN746559	-----	MN848371	-----	MN848406	MN854421
	CPO 27.719	<i>Persea americana</i>	México	-----	MN737355	MN746558	MN746530	MN848370	-----	MN848405	MN854420
<i>C. viniferum</i>	GZAAS 5.08608	<i>Vitis vinifera</i>	China	JN412802	JN412800	-----	JN412793	-----	-----	JN412784	-----
	GZAAS 5.08601*	<i>Vitis vinifera</i>	China	JN412804	JN412798	-----	JN412795	-----	-----	JN412787	-----
<i>C. xanthorrhoeae</i>	CBS 127831, ICMP 17903*	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Australia	JX010261	JX009927	JX009823	JX009478	JX010448	-----	JX010138	KC790689
<i>C. wuxiense</i>	JS1A44	<i>Camellia sinensis</i>	China	KU251592	KU252046	KU251940	KU251673	KU252201	-----	KU252102	-----
	CGMCC 3.17894, JS1A32*	<i>Camellia sinensis</i>	China	KU251591	KU252045	KU251939	KU251672	KU252200	-----	KU252101	KU251722

Colletotrichum acutatum complejo de especies

<i>C. abscissum</i>	COAD 1877*	<i>Citrus sinensis</i>	Brasil	KP843126	KP843129	KP843132	KP843141	KP843135	KP843138	-----	-----
<i>C. acutatum</i>	CBS 112996, ATCC 56816, STE-U 5292*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JQ005776	JQ948677	JQ005797	JQ005839	JQ005860	JQ005818	-----	-----
	CBS 979.69	<i>Coffea arabica</i>	Kenia	JQ948400	JQ948731	JQ949061	JQ949721	JQ950051	JQ949391	-----	-----
	IMI 319423, CPC 18877	<i>Coffea arabica</i>	Kenia	JQ948399	JQ948730	JQ949060	JQ949720	JQ950050	JQ949390	-----	-----
	CBS 127539, CPC 11738	<i>Aspalathus linearis</i>	Sudáfrica	JQ948377	JQ948708	JQ949038	JQ949698	JQ950028	JQ949368	-----	-----
<i>C. australisnense</i>	GX1654	<i>Hevea brasiliensis</i>	China	MG209621	MG241958	MG241976	MG241942	MG209643	-----	-----	-----
<i>C. bannaense</i>	YNBD42	<i>Hevea brasiliensis</i>	China	MG209637	MG242005	MG241995	MG242001	MG209659	-----	-----	-----
<i>C. cairnsense</i>	BRIP 63641	<i>Capsicum annuum</i>	Australia	KU923671	KU923703	KU923709	KU923715	KU923687	KU923721	-----	-----
	BRIP 63646	<i>Capsicum annuum</i>	Australia	KU923676	KU923708	KU923714	KU923720	KU923692	KU923726	-----	-----
<i>C. chrysanthemi</i>	CBS 126519, PD 85/694	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	Países Bajos	JQ948272	JQ948602	JQ948933	JQ949593	JQ949923	JQ949263	-----	-----
<i>C. citri</i>	CBS 134233*	<i>Citrus aurantiifolia</i>	China	KC293581	KC293741	KY856138	KY855973	KC293661	KY856309	-----	-----
<i>C. fioriniae</i>	CBS 293.67, DPI 13120	<i>Persea americana</i>	Australia	JQ948310	JQ948640	JQ948971	JQ949631	JQ949961	JQ949301	-----	-----
	CBS 129916, CPC 16823	<i>Vaccinium</i> sp.	EUA	JQ948317	JQ948647	JQ948978	JQ949638	JQ949968	JQ949308	-----	-----
	ATCC 28992, CPC 19391	<i>Malus domestica</i>	EUA	JQ948297	JQ948627	JQ948958	JQ949618	JQ949948	JQ949288	-----	-----

	CBS 129947, CR46, RB022	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	JQ948343	JQ948673	JQ949004	JQ949664	JQ949994	JQ949334	-----	-----
	CBS 127600, BRIP 20127a	<i>Persea americana</i>	Australia	JQ948308	JQ948638	JQ948969	JQ949629	JQ949959	JQ949299	-----	-----
	CBS 127614, DAOM 213712	<i>Fragaria x ananassa</i>	EUA	JQ948329	JQ948659	JQ948990	JQ949650	JQ949980	JQ949320	-----	-----
	CPO 27.835	<i>Persea americana</i>	México	MN744270	MN737329	MN746537	MN746504	MN848353	MN848378	-----	-----
	CPO 27.857	<i>Persea americana</i>	México	MN744271	MN737330	MN746538	MN746505	MN848354	-----	-----	-----
	CPO 27.871	<i>Persea americana</i>	México	MN744272	MN737331	MN746539	MN746506	MN848355	MN848379	-----	-----
<i>C. godetiae</i>	CBS 133.44*	<i>Clarkia hybrida</i>	Denmark	JQ948402	JQ948733	JQ949063	JQ949723	JQ950053	JQ949393	-----	-----
	CBS 796.72	<i>Aeschynomene virginica</i>	EUA	JQ948407	JQ948738	JQ949068	JQ949728	JQ950058	JQ949398	-----	-----
	CBS 129917, CPC 16002	<i>Schinus molle</i>	México	JQ948441	JQ948772	JQ949102	JQ949762	JQ950092	JQ949432	-----	-----
	CBS 129934, ALM-IKS-7Q	<i>Prunus dulcis</i>	Israel	JQ948431	JQ948762	JQ949092	JQ949752	JQ950082	JQ949422	-----	-----
	IMI 351262, CPC 18897	<i>Fragaria x ananassa</i>	Bélgica	JQ948422	JQ948753	JQ949083	JQ949743	JQ950073	JQ949413	-----	-----
	CBS 129816, T.A.8	<i>Solanum betaceum</i>	Colombia	JQ948440	JQ948771	JQ949101	JQ949761	JQ950091	JQ949431	-----	-----
	CBS 129809, T.A.1	<i>Solanum betaceum</i>	Colombia	JQ948439	JQ948770	JQ949100	JQ949760	JQ950090	JQ949430	-----	-----
	PPO-44377	<i>Malus domestica</i>	Países Bajos	KR180296	KR180293	KR180292	KR180290	KR180295	KR180294	-----	-----
	CPO 27.863	<i>Persea americana</i>	México	MN744273	MN737332	MN746540	MN746507	MN848356	MN848380	-----	-----
	CPO 27.907	<i>Persea americana</i>	México	MN744274	MN737333	MN746541	MN746508	MN848357	MN848381	-----	-----
	CPO 27.921	<i>Persea americana</i>	México	MN744275	MN737334	MN746542	MN746509	MN848358	MN848382	-----	-----
<i>C. guajavae</i>	IMI 350839, CPC 18893*	<i>Psidium guajava</i>	India	JQ948270	JQ948600	JQ948931	JQ949591	JQ949921	JQ949261	-----	-----
<i>C. johnstonii</i>	IMI 357027, CPC 18924	<i>Citrus</i> sp.	Nueva Zelanda	JQ948443	JQ948774	JQ949104	JQ949764	JQ950094	JQ949434	-----	-----
	CBS 128532, ICMP 12926*	<i>Solanum licopersicum</i>	Nueva Zelanda	JQ948444	JQ948775	JQ949105	JQ949765	JQ950095	JQ949435	-----	-----
<i>C. lupini</i>	CBS 109225, BBA 70884*	<i>Lupinus albus</i>	Ucrania	JQ948155	JQ948485	JQ948816	JQ949476	JQ949806	JQ949146	-----	-----

	CBS 122746, BPI 871840	<i>Lupinus</i> sp.	EUA	JQ948162	JQ948492	JQ948823	JQ949483	JQ949813	JQ949153	-----	-----
	CBS 109227, BBA 71310	<i>Lupinus luteus</i>	Polonia	JQ948173	JQ948503	JQ948834	JQ949494	JQ949824	JQ949164	-----	-----
<i>C. nymphaeae</i>	CBS 515.78*	<i>Nymphaea alba</i>	Países Bajos	JQ948197	JQ948527	JQ948858	JQ949518	JQ949848	JQ949188	-----	-----
	CBS 119294, MEP 1534	<i>Leucaena</i> sp.	México	JQ948205	JQ948535	JQ948866	JQ949526	JQ949856	JQ949196	-----	-----
	CBS 127612, DAOM 213709	<i>Fragaria x ananassa</i>	EUA	JQ948230	JQ948560	JQ948891	JQ949551	JQ949881	JQ949221	-----	-----
	IMI 345032, CPC 18883	<i>Fragaria x ananassa</i>	Italia	JQ948241	JQ948571	JQ948902	JQ949562	JQ949892	JQ949232	-----	-----
	CBS 482.82	<i>Protea</i> sp.	Australia	JQ948213	JQ948543	JQ948874	JQ949534	JQ949864	JQ949204	-----	-----
<i>C. phormii</i>	CPO 27.833	<i>Persea americana</i>	México	MN744276	MN737335	MN746543	MN746510	MN848359	MN848383	-----	-----
	CPO 27.843	<i>Persea americana</i>	México	MN744277	MN737336	MN746544	MN746511	MN848360	MN848384	-----	-----
	CBS 118194, AR 3546*	<i>Phormium</i> sp.	Alemania	JQ948446	JQ948777	JQ949107	JQ949767	JQ950097	JQ949437	-----	-----
	CBS 199.35, DSM 1168	<i>Phormium</i> sp.	UK	JQ948447	JQ948778	JQ949108	JQ949768	JQ950098	JQ949438	-----	-----
	CBS 118191, AR 3787	<i>Phormium</i> sp.	Sudáfrica	JQ948453	JQ948784	JQ949114	JQ949774	JQ950104	JQ949444	-----	-----
<i>C. pyricola</i>	CBS 128531, ICMP 12924, PRJ 977.1*	<i>Pyrus communis</i>	Nueva Zelanda	JQ948445	JQ948776	JQ949106	JQ949766	JQ950096	JQ949436	-----	-----
<i>C. salicis</i>	CBS 607.94*	<i>Salix</i> sp.	Países Bajos	JQ948460	JQ948791	JQ949121	JQ949781	JQ950111	JQ949451	-----	-----
	CBS 115.14	<i>Solanum lycopersicum</i>	Alemania	JQ948477	JQ948808	JQ949138	JQ949798	JQ950128	JQ949468	-----	-----
	CBS 129973, MP2, RB097	<i>Acer platanoides</i>	EUA	JQ948467	JQ948798	JQ949128	JQ949788	JQ950118	JQ949458	-----	-----
<i>C. scovillei</i>	CBS 126529, PD 94/921-3, BBA 70349*	<i>Capsicum</i> sp.	Indonesia	JQ948267	JQ948597	JQ948928	JQ949588	JQ949918	JQ949258	-----	-----
	CBS 122122, BRIP 28519*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JQ948276	JQ948606	JQ948937	JQ949597	JQ949927	JQ949267	-----	-----
	CBS 111531, STE-U 2090	<i>Protea cynaroides</i>	EUA	JQ948282	JQ948612	JQ948943	JQ949603	JQ949933	JQ949273	-----	-----
Colletotrichum boninense complejo de especies											
<i>C. annellatum</i>	CBS 129826*	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colombia	JQ005222	JQ005309	JQ005396	JQ005570	JQ005656	JQ005483	-----	-----

<i>C. beeveri</i>	CBS 128527, ICMP 18594*	<i>Brachyglottis repanda</i>	Nueva Zelanda	JQ005171	JQ005258	JQ005345	JQ005519	JQ005605	JQ005432	-----	-----
<i>C. boninense</i>	MAFF 306162, ICMP 18596	<i>Crinum asiaticum</i>	Japón	JQ005155	JQ005242	JQ005329	JQ005503	-----	JQ005416	-----	-----
	CBS 128506, ICMP 12950	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nueva Zelanda	JQ005157	JQ005244	JQ005331	JQ005505	JQ005591	JQ005418	-----	-----
	CBS 128526, ICMP 18591	<i>Dracrycarpus dacyrioides</i>	Nueva Zelanda	JQ005162	JQ005249	JQ005336	JQ005510	JQ005596	JQ005423	-----	-----
	CBS 128546, ICMP 18595	<i>Tecomanthe speciosa</i>	Nueva Zelanda	JQ005158	JQ005245	JQ005332	JQ005506	JQ005592	JQ005419	-----	-----
<i>C. brassicicola</i>	CBS 101059, LYN 16331*	<i>Brassica oleracea</i>	Nueva Zelanda	JQ005172	JQ005259	JQ005346	JQ005520	JQ005606	JQ005433	-----	-----
<i>C. camelliae- japonicae</i>	CGMCC3.18118, LC6416*	<i>Camellia japonica</i>	Japón	KX853165	KX893584	-----	KX893576	KX893580	-----	-----	-----
<i>C. catinaense</i>	CBS 142417, CPC 27978	<i>Citrus reticulata</i>	Italia	KY856400	KY856224	KY856136	KY855971	KY856482	KY856307	-----	-----
	CBS 142416, CPC 28019	<i>Citrus sinensis</i>	Portugal	KY856399	KY856223	KY856135	KY855970	KY856481	KY856306	-----	-----
<i>C. citricola</i>	CBS 134228, CGMCC 3.15227*	<i>Citrus unchii</i>	China	KC293576	KC293736	KC293792	KC293616	KC293656	KY856311	-----	-----
<i>C. colombiense</i>	CBS 129818*	<i>Passiflora edulis</i>	Colombia	JQ005174	JQ005261	JQ005348	JQ005522	JQ005608	JQ005435	-----	-----
	CBS 129817	<i>Passiflora edulis</i>	Colombia	JQ005173	JQ005260	JQ005347	JQ005521	JQ005607	JQ005434	-----	-----
<i>C. cymbidiicola</i>	CBS 123757, MAFF 306100	<i>Cymbidium</i> sp.	Japón	JQ005168	JQ005255	JQ005342	JQ005516	JQ005602	JQ005429	-----	-----
<i>C. karsti</i>	CBS 129833	<i>Musa</i> sp.	México	JQ005175	JQ005262	JQ005349	JQ005523	JQ005609	JQ005436	-----	-----
	MAFF 305973, ICMP 18598	<i>Passiflora edulis</i>	Japón	JQ005194	JQ005281	JQ005368	JQ005542	JQ005628	JQ005455	-----	-----
	CBS 127591	<i>Sapium integerrimum</i>	Australia	JQ005186	JQ005273	JQ005360	JQ005534	JQ005620	JQ005447	-----	-----
	CBS 124969, LCM 232	<i>Quercus salicifolia</i>	Panamá	JQ005179	JQ005266	JQ005353	JQ005527	JQ005613	JQ005440	-----	-----
	CBS 113087, STE- U 5288	<i>Malus</i> sp.	EUA	JQ005181	JQ005268	JQ005355	JQ005529	JQ005615	JQ005442	-----	-----
	CBS 861.72	<i>Bombax aquaticum</i>	Brasil	JQ005184	JQ005271	JQ005358	JQ005532	JQ005618	JQ005445	-----	-----

	CBS 128551, ICMP 12065	<i>Citrus</i> sp.	Nueva Zelanda	JQ005208	JQ005295	JQ005382	JQ005556	JQ005642	JQ005469	-----	-----
	CBS 129824, B1	<i>Musa</i> AAA	Colombia	JQ005215	JQ005302	JQ005389	JQ005563	JQ005649	JQ005476	-----	-----
	CBS 124956	<i>Zamia obliqua</i>	Panamá	JQ005216	JQ005303	JQ005390	JQ005564	JQ005650	JQ005477	-----	-----
	CBS 127552	<i>Eugenia uniflora</i>	Brasil	JQ005217	JQ005304	JQ005391	JQ005565	JQ005651	JQ005478	-----	-----
	CBS 106.91	<i>Carica papaya</i>	Brasil	JQ005220	JQ005307	JQ005394	JQ005568	JQ005654	JQ005481	-----	-----
	GA206	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620313	KX620247	KX620232	KX620150	KX620346	KX620298	-----	-----
	GA423	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620328	KX620262	KX620233	KX620165	KX620361	KX620299	-----	-----
	CP-CC029	<i>Coffea arabica</i>	México	KT122930	-----	-----	KT122920	KT122910	-----	-----	-----
	CP-CC031	<i>Coffea arabica</i>	México	KT122932	-----	-----	KT122922	KT122912	-----	-----	-----
	CPO 27.809	<i>Persea americana</i>	México	MN744280	MN737339	MN746547	MN746514	MN848361	MN848387	-----	-----
	CPO 27.902	<i>Persea americana</i>	México	MN744281	MN737340	MN746548	MN746515	-----	MN848388	-----	-----
	CPO 27.948	<i>Persea americana</i>	México	MN744282	MN737341	MN746549	MN746516	MN848362	MN848389	-----	-----
	CPO 27.953	<i>Persea americana</i>	México	MN744283	MN737342	MN746550	MN746517	MN848363	MN848390	-----	-----
<i>C. limonicola</i>	CBS 142410, CPC 31141	<i>Citrus limon</i>	Gozo	KY856472	KY856296	KY856213	KY856045	KY856554	KY856388	-----	-----
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	CPO 27.800	<i>Persea americana</i>	México	MN744278	MN737337	MN746545	MN746512	-----	MN848385	-----	-----
	CPO 27.818	<i>Persea americana</i>	México	MN744279	MN737338	MN746546	MN746513	-----	MN848386	-----	-----
<i>C. novae-zelandiae</i>	CBS 128505, ICMP 12944*	<i>Capsicum annuum</i>	Nueva Zelanda	JQ005228	JQ005315	JQ005402	JQ005576	JQ005662	JQ005489	-----	-----
<i>C. oncidii</i>	CBS 129828*	<i>Oncidium</i> sp.	Alemania	JQ005169	JQ005256	JQ005343	JQ005517	JQ005603	JQ005430	-----	-----
<i>C. petchii</i>	CBS 378.94*	<i>Dracaena marginata</i>	Italia	JQ005223	JQ005310	JQ005397	JQ005571	JQ005657	JQ005484	-----	-----
<i>C. phyllanthi</i>	CBS 175.67, MACS 271*	<i>Phyllanthus acidus</i>	India	JQ005221	JQ005308	JQ005395	JQ005569	JQ005655	JQ005482	-----	-----
<i>C. torulosum</i>	CBS 128544, ICMP 18586*	<i>Solanum melongena</i>	Nueva Zelanda	JQ005164	JQ005251	JQ005338	JQ005512	JQ005598	JQ005425	-----	-----
<i>C. hipeastrii</i>	CBS 125376, CSSG1*	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	JQ005231	JQ005318	JQ005405	JQ005579	JQ005665	JQ005492	-----	-----
<i>C. parsonsiae</i>	CBS 128525, ICMP 18590*	<i>Parsonsia capsularis</i>	Nueva Zelanda	JQ005233	JQ005320	JQ005407	JQ005581	JQ005667	JQ005494	-----	-----

<i>C. brasiliense</i>	CBS 128501, ICMP 18607*	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	JQ005235	JQ005322	JQ005409	JQ005583	JQ005669	JQ005496	-----	-----
	CBS 128528, ICMP 18606	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	JQ005234	JQ005321	JQ005408	JQ005582	JQ005668	JQ005495	-----	-----
<i>C. dacrycarpi</i>	CBS 130241, ICMP 19107*	<i>Dacrycarpus dacrydioides</i>	Nueva Zelanda	JQ005236	JQ005323	JQ005410	JQ005584	JQ005670	JQ005497	-----	-----
<i>C. constrictum</i>	CBS 128504, ICMP 12941*	<i>Citrus limon</i>	Nueva Zelanda	JQ005238	JQ005325	JQ005412	JQ005586	JQ005672	JQ005499	-----	-----
	CBS 128503, ICMP 12936	<i>Solanum betaceum</i>	Nueva Zelanda	JQ005237	JQ005324	JQ005411	JQ005585	JQ005671	JQ005498	-----	-----
<i>Colletotrichum magnum</i> complejo de especies											
<i>C. brevisporum</i>	BCC 38876*	<i>Neoregalia</i> sp.	Tailandia	JN050238	JN050227	-----	JN050216	JN050244	-----	-----	-----
	CBS 512.75	<i>Carica papaya</i>	Australia	MG600761	MG600821	MG600868	MG600965	MG601028	MG600907	-----	-----
	CBS 129957	<i>Anthurium</i> sp.	Tailandia	MG600762	MG600822	MG600869	MG600966	MG601029	MG600908	-----	-----
	MAFF 305751	<i>Passiflora edulis</i>	Japón	MG600764	MG600824	MG600871	MG600968	MG601031	-----	-----	-----
	COUFAL0053	<i>Capsicum</i> sp.	Brasil	KY319117	KY319099	KY319129	KY319123	KY319108	-----	-----	-----
	MPU110	<i>Capsicum chinense</i>	Brasil	-----	KU315576	-----	KU315571	-----	-----	-----	-----
	CCCM12	<i>Cucurbita</i> sp.	China	KY797632	-----	KY797631	KY797629	KY797630	-----	-----	-----
<i>C. cacao</i>	CBS 119297*	<i>Theobroma cacao</i>	Costa Rica	MG600772	MG600832	MG600878	MG600976	MG601039	MG600916	-----	-----
<i>C. liaoningense</i> 1	CGMCC 3.17616, CAUOS2*	<i>Capsicum annuum</i>	China	KP890104	KP890135	KP890127	KP890097	KP890111	-----	-----	-----
	CAUOS6	<i>Capsicum annuum</i>	China	-----	-----	KP890131	-----	KP890115	-----	-----	-----
<i>C. liaoningense</i> 2	CAUOS3	<i>Capsicum annuum</i>	China	KP890105	KP890136	KP890128	-----	KP890112	-----	-----	-----
<i>C. lobatum</i>	IMI 79736*	<i>Piper catalpaefolium</i>	Trinidad and Tobago	MG600768	MG600828	MG600874	MG600972	MG601035	MG600912	-----	-----
<i>C. magnum</i>	CBS 519.97*	<i>Citrullus lanatus</i>	EUA	MG600769	MG600829	MG600875	MG600973	MG601036	MG600913	-----	-----
	IMI 391662	<i>Citrullus lanatus</i>	EUA	MG600771	MG600831	MG600877	MG600975	MG601038	MG600915	-----	-----
<i>C. merremiae</i>	CBS 124955*	<i>Merremia umbellata</i>	Panamá	MG600765	MG600825	MG600872	MG600969	MG601032	MG600910	-----	-----
<i>C. okinawense</i>	MAFF 240517	<i>Carica papaya</i>	Japón	MG600767	MG600827	-----	MG600971	MG601034	-----	-----	-----
	PC-1	<i>Carica papaya</i>	Taiwan	KX756146	KX756148	-----	MF401549	MF401550	-----	-----	-----
<i>C. panamense</i>	CBS 125386*	<i>Merremia umbellata</i>	Panamá	MG600766	MG600826	MG600873	MG600970	MG601033	MG600911	-----	-----

<i>Colletotrichum</i> sp. 2	CPO 27.832	<i>Persea americana</i>	México	MN744297	MN737357	MN746560	MN746531	MN848372	MN848391	-----	-----
	CPO 27.999	<i>Persea americana</i>	México	MN744298	MN737358	MN746561	MN746532	MN848373	MN848392	-----	-----
	CPO 27.1003	<i>Persea americana</i>	México	MN744299	MN737359	MN746562	MN746533	MN848374	MN848393	-----	-----
<i>Colletotrichum</i> sp.	GZAAS5.09545	<i>Citrus medica</i>	China	JQ247623	JQ247599	-----	JQ247647	JQ247635	-----	-----	-----
	COUFAL7300	<i>Sechium edule</i>	Brasil	KT285382	KT285381	KT285380	KT285378	KT285383	-----	-----	-----
	LJTJ24	<i>Capsicum</i> sp.	China	KP748215	KP823794	-----	KP823736	-----	-----	-----	-----

ATCC: American Type Culture Collection; BBA: Culture collection of the Biologische Bundesanstalt fur Land-und Forstwirtschaft; BRIP: Queensland Plant Pathology Herbarium; CPC: Culture Collection of Pedro W. Crous; CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; CMM: Culture Collection of Phytopathogenic Fungi; DPI: Department of Primary Industries; GMCC: China, General Microbiological Culture Collection; GZAAS: Guizhou Academy of Agricultural Sciences Herbarium; ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants; IMI: Culture Collection of CABI Europe; LC: Working collection of Lei Cai; LF: Working collection of Fang Liu; MAFF Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japón; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection; PD: Plantenziektenkundige Dienst Wageningen; CPO: Colegio de Postgraduados.

*Indica cultivos ex-tipo

Cepas y números de accesión generadas en este estudio se presentan en negritas.

1.4.6 Caracterización morfológica y cultural

Se seleccionaron cepas representativas incluyendo todas las especies, para la caracterización cultural y morfológica. Para el cálculo de la tasa de crecimiento, se colocaron discos de PDA (0.5 cm de diámetro) con micelio en crecimiento activo en el centro de cajas Petri y se incubaron a 25 °C en oscuridad por 5 días. Se registraron medidas ortogonales de cuatro repeticiones (cajas Petri) por especie evaluada. Otros discos de PDA se colocaron en PDA y Spezieller Nahrstofffarmer agar (SNA) suplementado con fasículas de pino, y se incubaron a 25 °C con un fotoperiodo de 12 h oscuridad/luz fluorescente por 5 y 20 días, respectivamente. Diversas estructuras (conidios, peritecios, ascas o ascosporas) se colocaron sobre portaobjetos con ácido láctico claro, y se observaron en un microscopio BX51 (Olympus, Japón). Posteriormente, se tomaron medidas de 50 estructuras, usando fotos previamente tomadas con una cámara Infinity 1-2 C, mediante el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Los apresorios se indujeron con la técnica de portaobjetos (Yang *et al.*, 2009) y se analizaron de la misma forma.

1.4.7 Pruebas de patogenicidad

La patogenicidad se evaluó con una cepa representativa por cada especie (*C. siamense* CPO 27.415, *C. chrysophilum* CPO 27.408, *C. tropicale* CPO 27.477, *C. jiangxiense* CPO 27.850, *C. cigarro* CPO 27.939, *C. karsti* CPO 27.953, *Colletotrichum* sp. 1 CPO 27.818, *C. godetiae* CPO 27.907, *C. fioriniae* CPO 27.857, *C. nymphaeae* CPO 27.833, y *Colletotrichum* sp. 2 CPO 27.832). Los conidios se obtuvieron de las colonias creciendo en PDA a 25 °C en luz fluorescente constante por 7 días. Las suspensiones se ajustaron a 1×10^6 conidios mL⁻¹ usando una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania). Frutos de aguacate cv. Hass se lavaron con agua corriente, se desinfestaron con alcohol al 70% por 2 min,

seguido de hipoclorito de sodio al 1.5% por 3 min, y enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Los frutos se limpiaron con toallitas estériles y se dejaron secar a temperatura de laboratorio (20 °C). Posteriormente, se inocularon 7 μ l sobre dos puntos en frutos con herida y se incubaron a 25 °C en oscuridad (Sharma et al., 2017). Cada especie de *Colletotrichum* inoculada constó de ocho repeticiones (un fruto con dos puntos de inoculación por repetición). Los testigos se trajeron con agua destilada esterilizada. El porcentaje de incidencia se calculó con la fórmula PDI = puntos de inoculación infectados/puntos de inoculación) \times 100 (Sharma et al., 2015; Guarnaccia et al., 2017). La severidad de la enfermedad se registró midiendo ortogonalmente el diámetro de la lesión a los 7 días después de la inoculación.

1.4.8 Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la tasa de crecimiento, longitud de lesión en las pruebas de patogenicidad, tamaño de conidios y apresorios usando el programa estadístico agricolae (<https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html>) implementado en la interface de R (R Core Team). Previamente, se verificó la homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos. Las gráficas de prevalencia y longitud de lesión en las pruebas de patogenicidad, se construyeron con el programa ggplot2 (Wickham, 2016) implementado en R.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Diversidad genética a través de la red de haplotipos

Se detectaron 16 haplotipos en base a 104 secuencias del gapdh, conformado por 238 sitios, con un valor de $hd=0.824$ (diversidad haplotípica), $s^2hd=0.0007$ (varianza de la diversidad haplotípica), 104 sitios segregantes y un total de 166 mutaciones. Todos los haplotipos se

representaron en una red (Figura 1.). Con base en la búsqueda BLAST, los haplotipos se agruparon en *C. gloeosporioides* CE (H1 a H9), *C. boninense* CE (H10 a H12), *C. acutatum* CE (H14 a H16) y *C. magnum* CE (H13). *Colletotrichum gloeosporioides* CE presentó el mayor número de haplotipos (9), y el H1 fue el más abundante. Finalmente, se seleccionaron 31 cepas, con base en el haplotipo y lugar de muestreo, para el análisis filogenético multilocus.

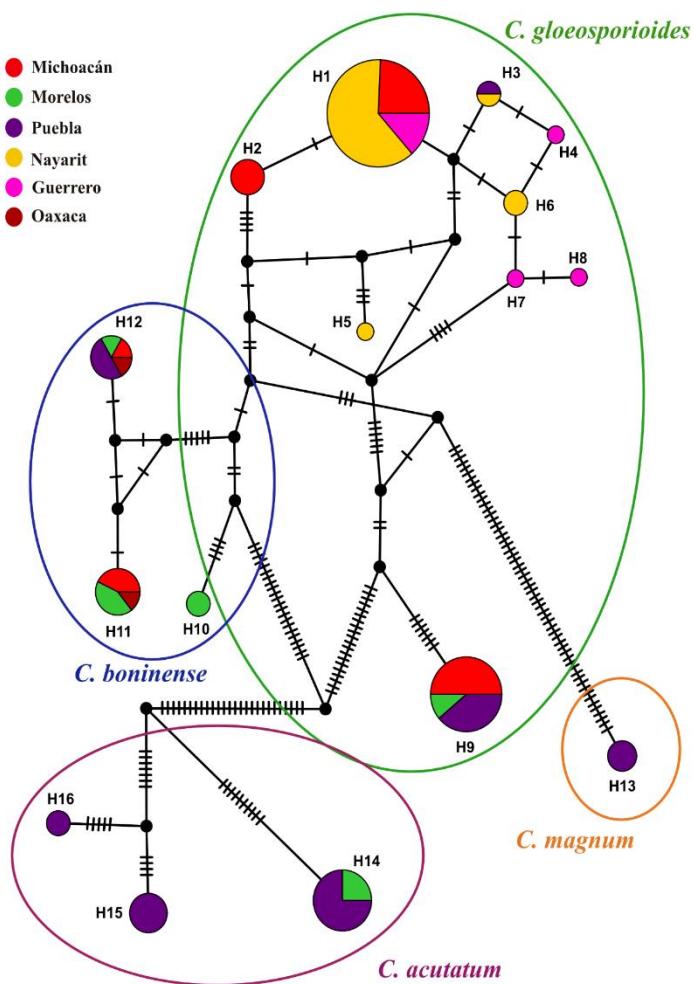


Figura 1. Red de haplotipos construida con 104 secuencias parciales del gen *gapdh*, correspondientes a aislamientos obtenidos de frutos con síntomas de antracnosis en México. El tamaño del círculo representa el número de secuencias que se agruparon en el mismo haplotipo. Los guiones representan las sustituciones entre haplotipos relacionados. La red se construyó en POPART usando el algoritmo Templeton, Crandall y Sing (TCS).

1.5.2 Análisis filogenético multilocus

La filogenia de las secuencias concatenadas de *C. gloeosporioides* CE, *C. boninense* CE, *C. acutatum* CE y *C. magnum* consistió de 89, 51, 55 y 25 secuencias, respectivamente, incluyendo los fuera de grupo. Para *C. gloeosporioides* se incluyeron 4048 caracteres (ITS: 1–567, *gapdh*: 574–872, *act*: 879–1169, *tub2*: 1176–1915, *ApMat*: 1922–2825, *gs*: 2832–3762, *chs-1*: 3769–4048). Para *C. boninense* CE fueron 2345 caracteres (ITS: 1–561, *gapdh*: 568–861, *chs-1*: 868–1147, *act*: 1154–1435, *tub2*: 1442–1945 and *his3*: 1952–2345). Para *C. acutatum* CE fueron 2415 (ITS: 1–553, *gapdh*: 560–826, *chs-1*: 833–1115, *act*: 1122–1396, *tub2*: 1403–2020 and *his3*: 2027–2415) y para *C. magnum* fueron 2413 (ITS: 1–544, *gapdh*: 551–800, *chs-1*: 807–1070, *act*: 1077–1334, *tub2*: 1341–2026 y *his3*: 2033–2413).

Se guardaron un máximo de 1000 árboles igualmente parsimoniosos, y las características de las particiones de los genes concatenados usados en el análisis filogenético, se reportan en el Cuadro 3. Los valores de soporte bootstrap se colocaron en los árboles Bayesianos (Figuras 2-5). Para todos los análisis Bayesianos, se seleccionaron e incorporaron los mejores modelos de sustitución nucleotídica usando MrModeltest 2.4. (Nylander, 2004) (Cuadro 4). El patrón de sitios únicos para cada partición y todos los parámetros del análisis Bayesiano se reportaron en el Cuadro 3. En *C. gloeosporioides* CE se agruparon con las cepas de referencia de *C. cigarro*, *C. jiangxiense*, *C. chrysophilum*, *C. tropicale* y *C. siamense* (Figura 2). El árbol final que se generó para *C. boninense* CE mostró cuatro cepas agrupadas con *C. karstii*, y dos cepas como un linaje diferente llamado, en este estudio *Colletotrichum* sp. 1 (PIH=1.0) (Figura 3). Además, las cepas incluidas en el análisis de *C. acutatum* CE, se agruparon con *C. nymphaeae*, *C. fioriniae* y *C. godetiae* (Figura 4). Por último, el árbol filogenético para *C. magnum* CE mostró tres cepas que no se agruparon

con ninguna referencia, siendo un nuevo linaje llamado en este estudio *Colletotrichum* sp. 2 (PHI=1.0) (Figura 5).

Cuadro 3. Parámetros de las particiones de los análisis filogenéticos, mediante Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana, para cada complejo de especies (CE) del género *Colletotrichum* identificados en el presente estudio.

	<i>C. gloeosporioides</i> CE	<i>C. boninense</i> CE	<i>C. acutatum</i> CE	<i>C. magnum</i> CE	
Loci	ITS+ <i>gapdh</i> + <i>act</i> + <i>tub2</i> + <i>ApMat</i> + <i>gs</i> + <i>chs-1</i>	ITS+ <i>gapdh</i> + <i>chs-1</i> + <i>act</i> + <i>tub2</i> + <i>his3</i>	ITS+ <i>gapdh</i> + <i>chs-1</i> + <i>act</i> + <i>tub2</i> + <i>his3</i>	ITS+ <i>gapdh</i> + <i>chs-1</i> + <i>act</i> + <i>tub2</i> + <i>his3</i>	
Total de sitios	4048	2345	2415	2413	
Sitios constantes	2025	1525	1708	1525	
Sitios variables	809	277	328	277	
Máxima Parsimonia	Sitios parsimonios informativos Longitud de árbol Índice de consistencia Índice de retención Índice de consistencia reescalado	1178 3381 0.756 0.905 0.684	513 1540 0.731 0.871 0.637	349 1097 0.766 0.924 0.708	513 1540 0.731 0.871 0.637
Inferencia Bayesiana	P.S.U. ¹ ITS P.S.U. <i>gapdh</i> P.S.U. <i>act</i> P.S.U. <i>tub2</i> P.S.U. <i>ApMat</i> P.S.U. <i>gs</i> P.S.U. <i>chs-1</i> P.S.U. <i>his3</i> Generaciones corridas Árboles generados Árboles muestreados	107 215 133 322 558 453 89 - 2785000 5572 4180	95 191 124 215 - - 64 108 455000 912 684	80 124 98 137 - - 60 94 1180000 2362 1772	68 100 68 135 - - 41 53 585000 1172 880

PSU: Patrón de sitios únicos

Cuadro 4. Modelos evolutivos seleccionados con MrModelTest para los complejos de especies (CE) del género *Colletotrichum*, e incluidos en el análisis Bayesiano para la reconstrucción flogenética

Complejo de especies	Locus	Evolutionary model ¹
<i>C. gloeosporioides</i>	ITS	GTR+G
	<i>gapdh</i>	HKY+G
	<i>act</i>	HKY+G
	<i>tub2</i>	GTR+G
	<i>ApMat</i>	K80+G
	<i>gs</i>	GTR+G
	<i>chs-1</i>	SYM+G
<i>C. boninense</i>	ITS	SYM+I+G
	<i>gapdh</i>	HKY+G
	<i>chs-1</i>	K80+G
	<i>act</i>	HKY+G
	<i>tub2</i>	K80+G
	<i>his3</i>	GTR+G
<i>C. acutatum</i>	ITS	GTR+I+G
	<i>gapdh</i>	K80+G
	<i>chs-1</i>	SYM+G
	<i>act</i>	GTR
	<i>tub2</i>	HKY+G
	<i>his3</i>	GTR+G
<i>C. magnum</i>	ITS	JC+G
	<i>gapdh</i>	K80+G
	<i>chs-1</i>	SYM+G
	<i>act</i>	HKY
	<i>tub2</i>	HKY
	<i>his3</i>	HKY+G

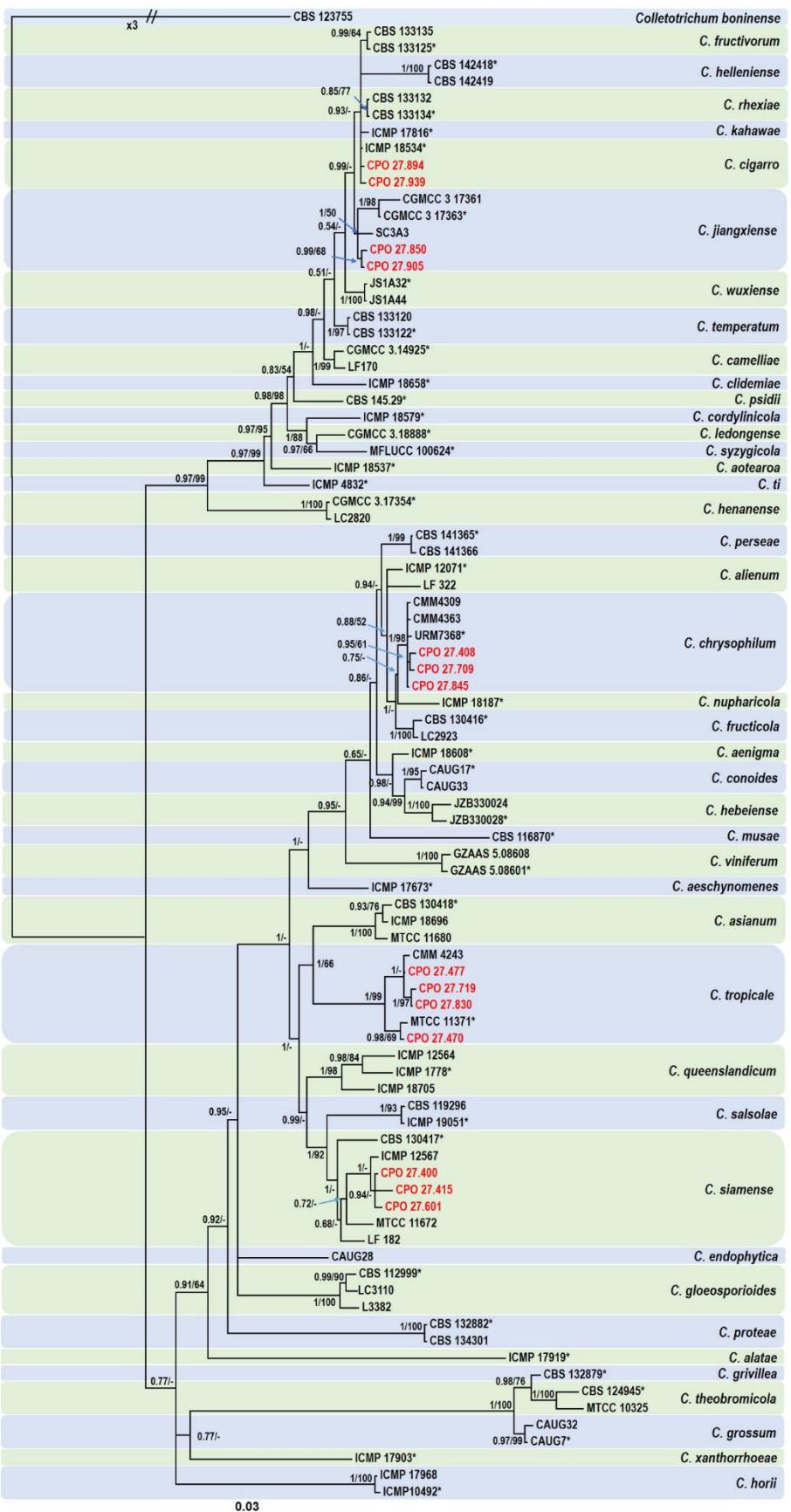


Figura 2. Árbol filogenético Bayesiano correspondiente a 14 cepas del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* reconstruido con secuencias parciales concatenadas de la

región ITS y los genes *gapdh*, *chs-1*, *act*, *tub2*, *gs*, y *ApMat*. Las cepas colectadas en este estudio se representan en rojo. La escala representa sustituciones por sitio. Las probabilidades posteriores y soporte bootstrap se representan en los nodos (PP/SB). *Colletotrichum boninense* cepa 123755 se usó como fuera de grupo.

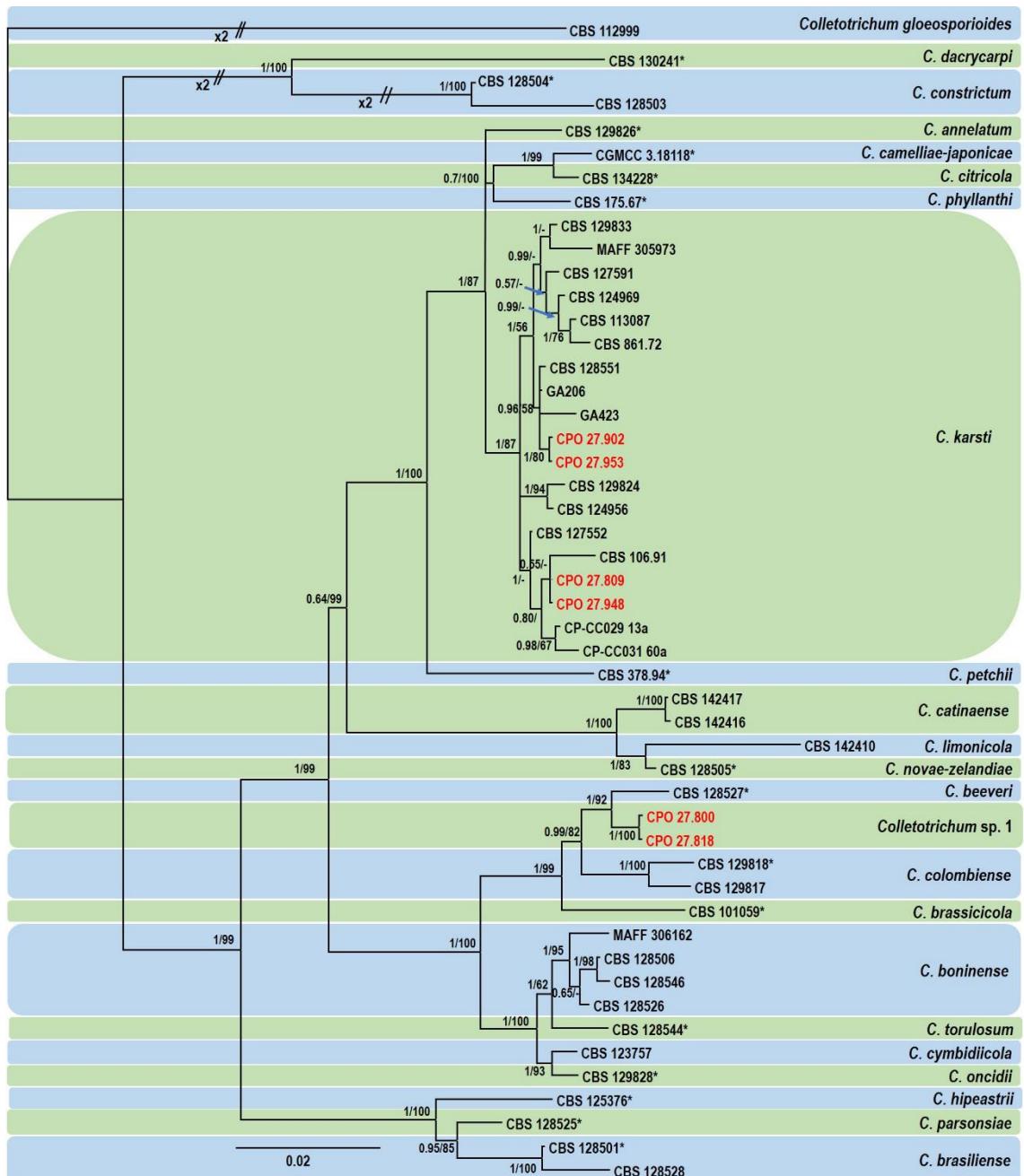


Figura 3. Árbol filogenético Bayesiano correspondiente a 6 cepas del complejo *s* *Colletotrichum boninense* reconstruido con secuencias concatenadas de la región ITS y los genes parciales *gapdh*, *chs-1*, *act*, *tub2* y *his3*. Las cepas colectadas en este estudio se muestran en rojo. La escala indica sustituciones por sitio. Los valores de probabilidades

posteriores y soporte bootstrap se muestran en los nodos. *Colletotrichum gloeosporioides* cepa CBS 112999 se usó como fuera de grupo.

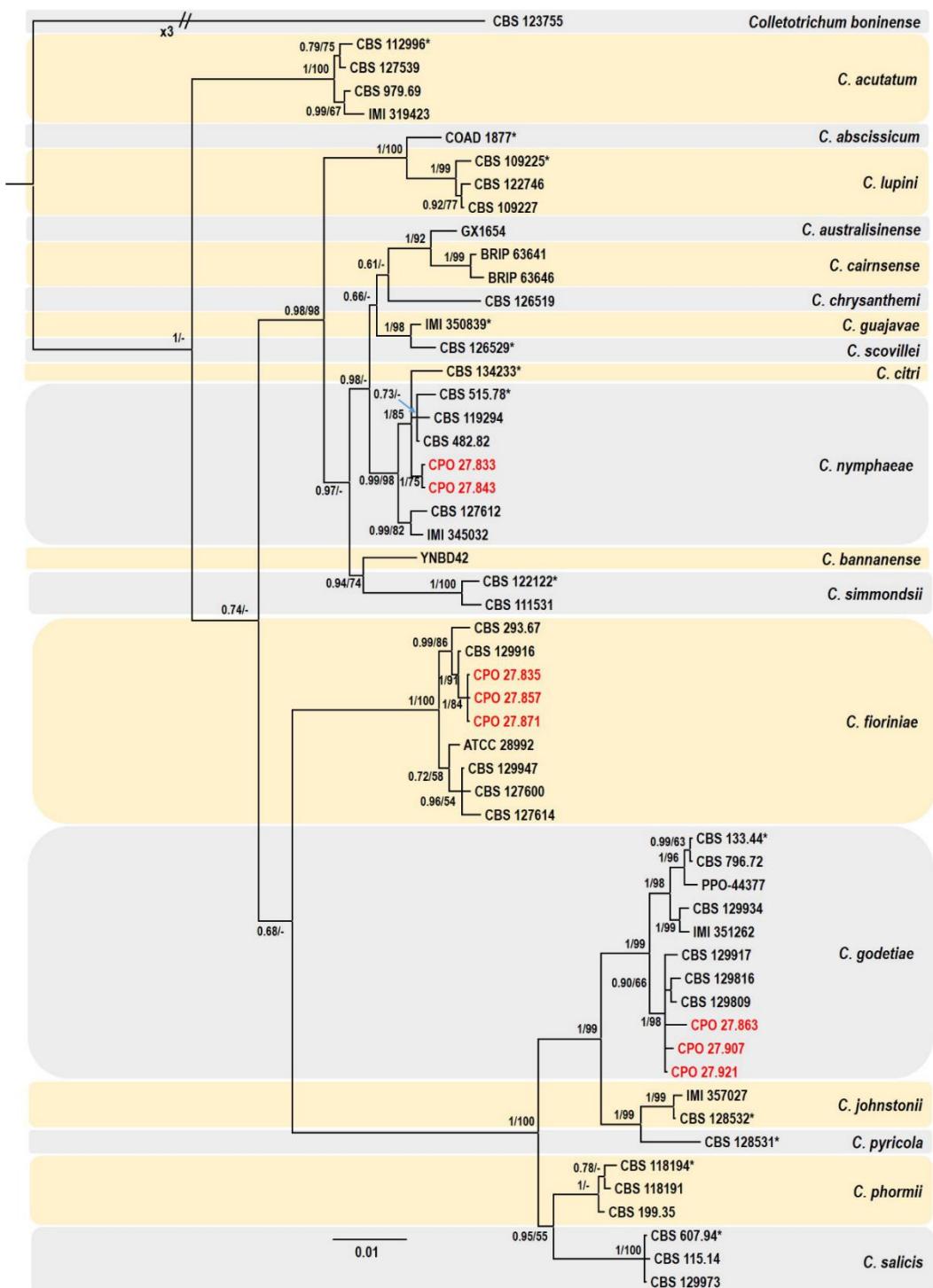


Figura 4. Árbol filogenético Bayesiano correspondiente a 8 cepas del complejo *Colletotrichum acutatum* reconstruido con secuencias parciales concatenadas de la región ITS y los genes parciales *gapdh*, *chs-1*, *act*, *tub2*, y *his3*. Las cepas colectadas en este estudio se muestran en rojo. La escala indica sustituciones por sitio. Los valores de las

probabilidades posteriores y soportes bootstrap se muestran en los nodos. *Colletotrichum boninense* cepa CBS 123755 se usó como fuera de grupo.

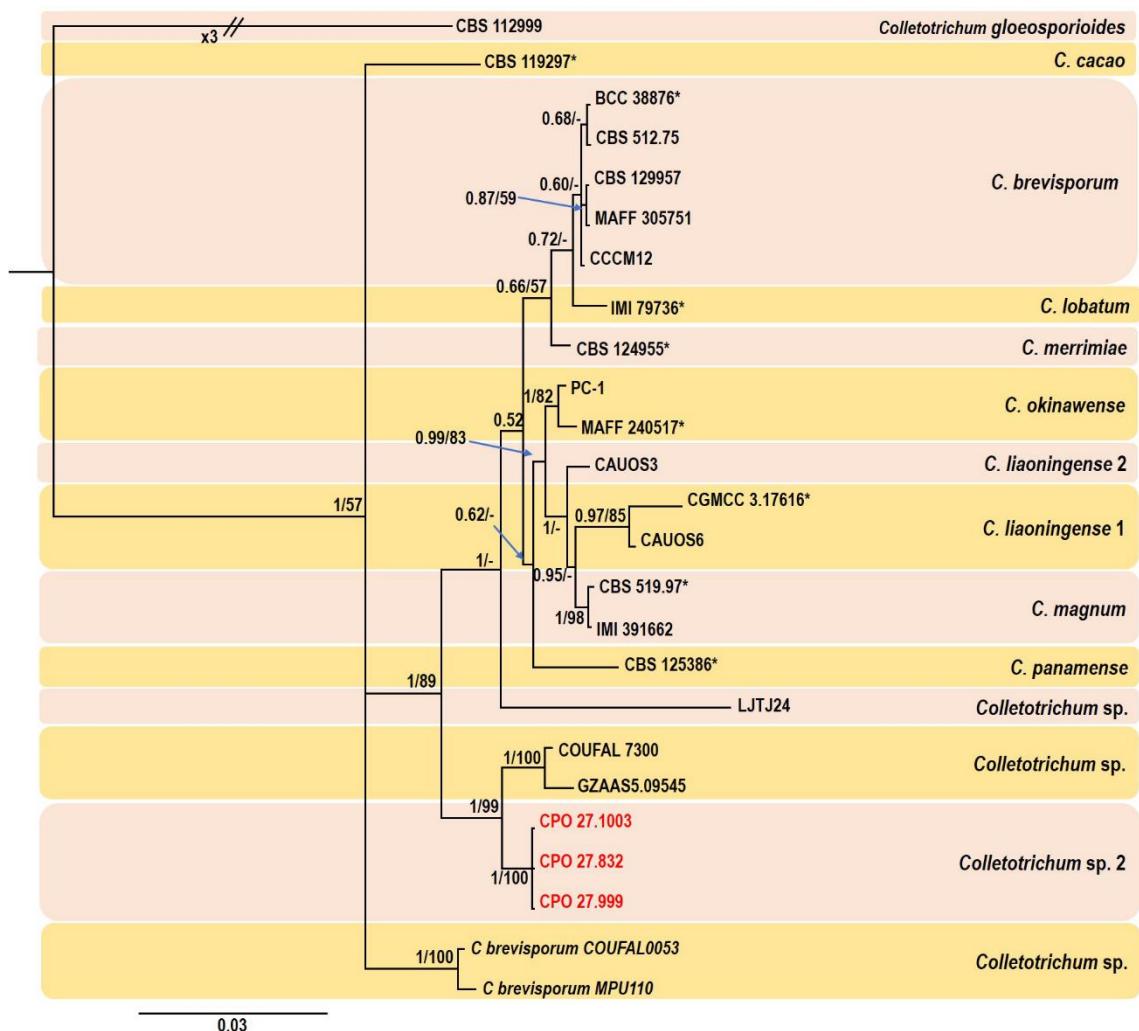


Figura 5. Árbol filogenético Bayesiano correspondiente a 3 cepas del complejo *Colletotrichum magnum* reconstruido con secuencias parciales concatenadas de la región ITS y los genes parciales *gapdh*, *chs-1*, *act*, *tub2* y *his3*. Las cepas colectadas en este estudio se muestran en rojo. La escala indica sustituciones por sitio. Los valores de las probabilidades posteriores y soportes bootstrap se muestran en los nodos. *Colletotrichum gloeosporioides* cepa CBS 112999 se usó como fuera de grupo.

Las pruebas del índice de homoplasia mostraron valores de 1.0 para los dos nuevos linajes, confirmando la ausencia de recombinación genética con los clados más cercanos (Figura 6). Por lo tanto, ambos linajes representan nuevas especies. Sin embargo, para su

descripción formal es necesario el depósito de cultivos vivos en el banco de hongos (<http://www.mycobank.org/>).

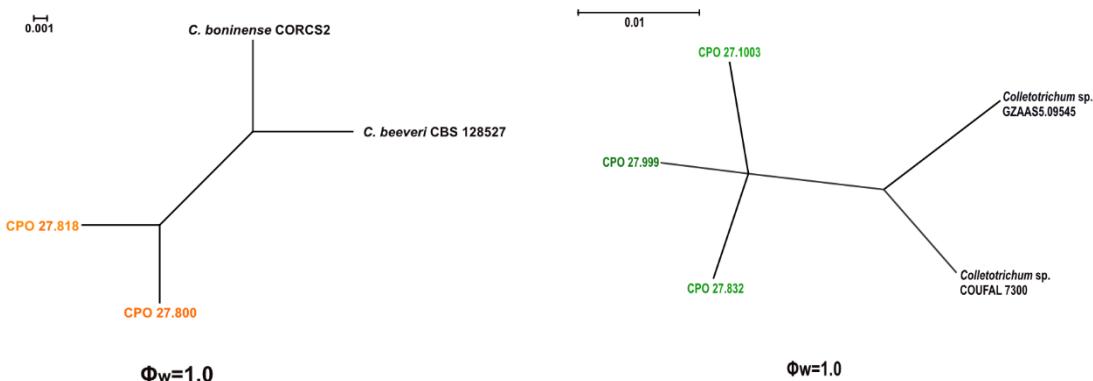


Figura 6. Resultados de las pruebas de índice de homoplasia de los nuevos linajes *Colletotrichum* sp. 1 (CPO 27.818, CPO 27.800) y *Colletotrichum* sp. 2 (CPO 27.832, CPO 27.999, CPO 27.1003) con los clados más cercanos. Un valor de $\phi_w < 0.05$ indica recombinación genética.

1.5.3 Caracterización morfológica y cultural

Las características culturales y morfológicas fueron diferentes entre las especies (Cuadro 5).

Hubo diferencias significativas en tasa de crecimiento, tamaños de conidio y apresorio ($p < .0001$). Los miembros de *C. gloeosporioides* CE crecieron más rápido ($> 5.40 \text{ mm d}^{-1}$) que otros complejos de especies, excepto *C. cigarro*, que tuvo el crecimiento más lento (1.99 mm d^{-1}). Las especies remanentes presentaron una tasa de crecimiento en un rango de 2.27 a 5.40 mm d^{-1} . La forma del conidio pudo distinguir entre tres complejos de especies. *Colletotrichum gloeosporioides* CE presentó conidios rectos y redondeados en los extremos, mientras que los conidios de *C. boninense* CE presentaron una cicatriz visible en la base, y los conidios de *C. acutatum* fueron agudos en, al menos, un extremo. *Colletotrichum* sp. 2, perteneciente a *C. magnum* CE, tuvo conidios similares en forma que *C. gloeosporioides* CE. El tamaño de los conidios en PDA y SNA fueron similares para cada especie, a

excepción de *C. jiangxiense*, en el cual la longitud fue 2 mm más grande en SNA. El tamaño de los conidios no puede delimitar las especies o complejos de especies. En general, *C. siamense* y *C. jiangxiense* tuvieron los conidios más largos ($\geq 15 \mu\text{m}$) en PDA y SNA, y *Colletotrichum* sp. 1 tuvo lo más anchos ($> 6 \mu\text{m}$) en ambos medios (Figura 7). Los conidios de las especies remanentes midieron de $13.4\text{--}14.6 \times 3.8\text{--}5.0 \mu\text{m}$ y $12\text{--}14.8 \times 3.4\text{--}5.4 \mu\text{m}$ en PDA y SNA, respectivamente. Los apresorios mostraron variabilidad en tamaño y forma, pero no fueron consistentes entre especies o complejos de especies (Figura 7).

Colletotrichum jiangxiense, *C. chrysophilum* y *C. karsti* presentaron la fase sexual en PDA. Las últimas dos especies presentaron características de ascomatas, ascas y ascosporas similares a reportes previos por Vieira *et al.* (2017) y Damm *et al.* (2012a), respectivamente. La fase sexual de *C. jiangxiense* se reporta por primera vez en este estudio. Esta especie desarrolló *ascomata* peritecial después de 10 días incubada a 25°C con un fotoperíodo de 12 h oscuridad/luz fluorescente, semiinmerso o inmerso en el agar, no estomático, subesférico a ovoide, café a café oscuro, con medidas de $145\text{--}190 \times 124\text{--}165 \mu\text{m}$ (largo \times ancho). Ascas unitunicadas, con 8 esporas, subcilíndricas a clavadas, haciéndose agudas hacia el ápice y la base, pared lisa, midiendo $89.1\text{--}60.2 \times 12.5\text{--}8.5 \mu\text{m}$. Las ascosporas arregladas en dos series, sin septos, hialinas, pared lisa, fusiformes, con uno o dos extremos redondeados, midiendo $19.9\text{--}12.9 \times 6.6\text{--}3.6 \mu\text{m}$ (Figura 8).

Cuadro 5. Características morfológicas determinadas en medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA) y Spezieller Nahrstofffarmer agar (SNA), y tasa de crecimiento de 11 especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de aguacate en México

Especie	Cepa	Colonias en PDA	Conidios		Apresorios	Tasa de crecimiento (mm día ⁻¹)
			PDA	SNA		
			Media (μm) ^a	Media (μm)		
			L × A	L × A	L × A	L × A
<i>C. siamense</i>	CPO 27.415	Micelio aéreo abundante algodonoso, blanco claro a gris, reverso gris oliváceo en el margen, y gris claro en el centro	15.9b × 4.6cd	15.4ab × 4.1f	8.5de × 5.8ab	5.98a
<i>C. chrysophilum</i>	CPO 27.408	Micelio aéreo abundante, algodonoso verde oliváceo, presencia de abundante ascomatas en el centro, color negro, reverso blanco a gris claro en el margen y gris a negro en el centro	No producidos	14.3c × 4.5e	9.0bcde × 6.1a	6.23a
<i>C. tropicale</i>	CPO 27.477	Micelio superficial blanco a gris claro, abundante acérvulos anaranjados en el centro, formando un anillo, circulando el centro color gris a negro, reverso blanco, con las mismas características que la vista frontal	14.6c × 4.7bc	14.3c × 3.9f	10.9a × 5.5abc	6.04a
<i>C. cigarro</i>	CPO 27.939	Micelio denso, blanco y con margen entero, reverso blanco en el margen, anaranjado pálido en el centro	13.6d × 3.8f	14.4c × 4.6de	8.8cde × 5.6abc	1.99c
<i>C. jiangxiense</i>	CPO 27.850	Micelio denso algodonoso, verde oliváceo, blanco claro en el margen, acérvulos anaranjado al lado del disco de PDA inoculado, y pocos acérvulos cubiertos por el micelio denso, reverso con muchas manchas negras a grises, de diferente tamaño, margen blanco	17.0a × 5.0b	15.0bc × 4.8c	9.7abcd × 5.6abc	5.44ab
<i>C. karsti</i>	CPO 27.953	Micelio delgado y superficial, blanco a verde oliváceo pálido, poco micelio aéreo en el	No producidos	13.2d × 5.4b	10.4ab × 9.5abc	5.40ab

		centro, reverso anaranjado pálido, estriado paralelo al diámetro de la colonia				
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	CPO 27.818	Micelio blanco, con abundantes acérvulos y secreción anaranjado distribuido en el centro, reverso blanco en el margen y anaranjado pálido en el centro, con pequeñas manchas grises	14.2cd × 6.1a	14.4c × 6.3a	9.9abc × 6.2a	3.83abc
<i>C. godetiae</i>	CPO 27.863	Micelio denso café pálido, margen crenado a crenulado, sin acérvulos visibles en la vista frontal, reverso anaranjado en el centro y margen blanco, con líneas negras irregulares circulando el centro	14.6c × 4.4de	14.8bc × 4.4e	8.9cde × 5.3bc	2.27c
<i>C. fioriniae</i>	CPO 27.857	Micelio blanco superficial y delgado encima del micelio denso, rosa a rosa pálido, margen con micelio blanco, con algunos acérvulos al lado del disco de PDA inoculado, reverso rosa a rojo claro en el centro	13.8cd × 4.5de	13.5d × 3.9f	8.6de × 5.0cd	3.83abc
<i>C. nymphaeae</i>	CPO 27.833	Micelio banco algodonoso, margen entero, abundantes acérvulos anaranjados visibles dispersos en el centro, reverso blanco en el margen, amarillo cremoso a gris claro en el centro, con pequeños manchas negras a grises	13.4d × 4.4de	12.0e × 3.4g	8.1e × 4.5d	5.26ab
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	CPO 27.832	Micelio superficial y denso, margen con ondulado, gris a verde oliváceo en el centro, y gris pálido en el margen, reverso anaranjado pálido y gris a negro en el centro	14.0cd × 4.3e	16.1a × 4.7cd	8.9cde × 5.7abc	3.09bc

L × A = Largo por Ancho

Valores con letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$)

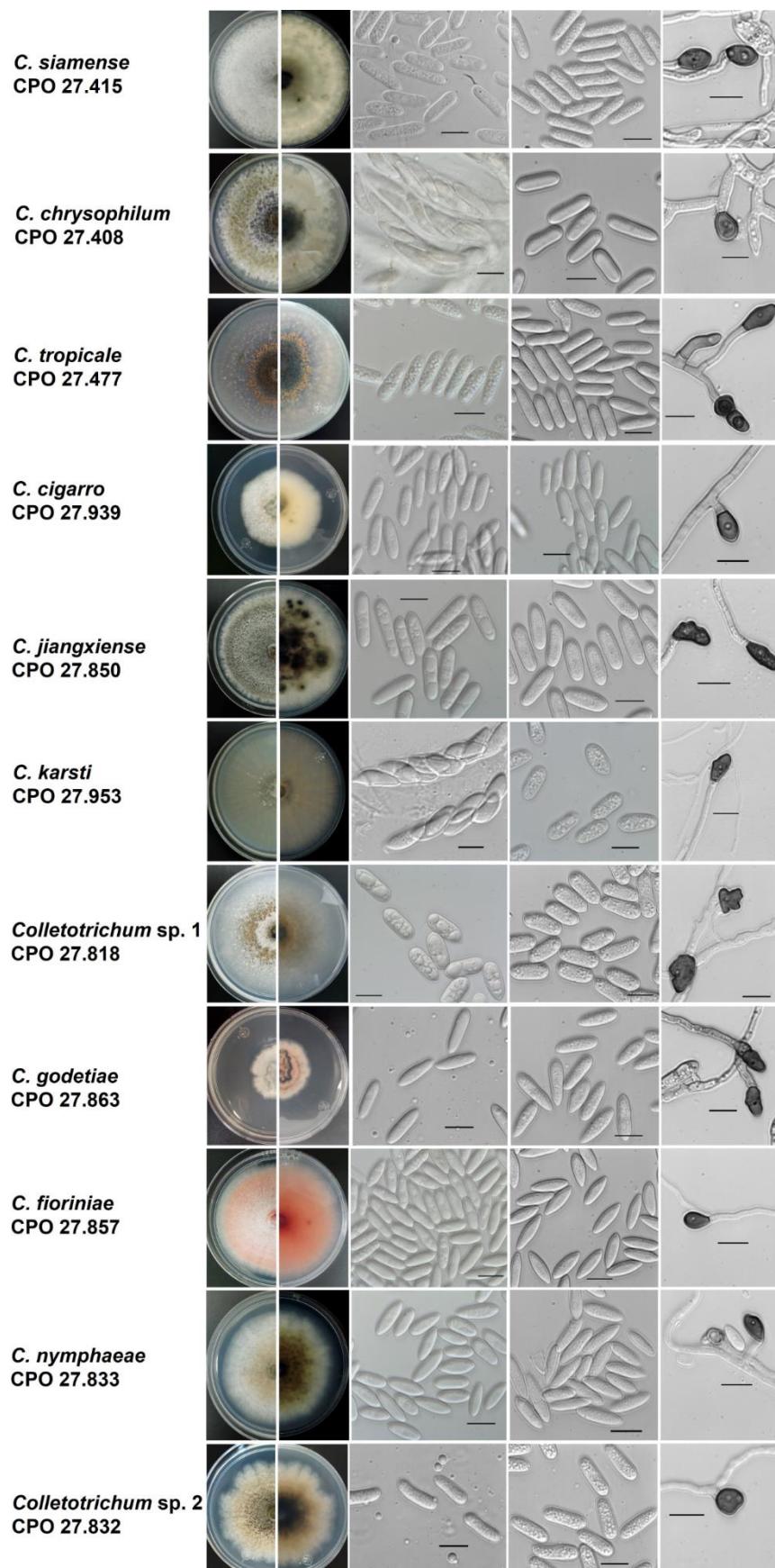


Figura 7. Características culturales y morfológicas de 11 especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de aguacate en México. En orden de izquierda a derecha,

vista frontal de la colonia en papa dextrosa agar (PDA) a los 10 días, vista del reverso en PDA, conidios o ascosporas en PDA, conidios en Spezieller Nahrstofffarmer agar (SNA), y apresorios. Escala en todas las figuras = 10 μ m

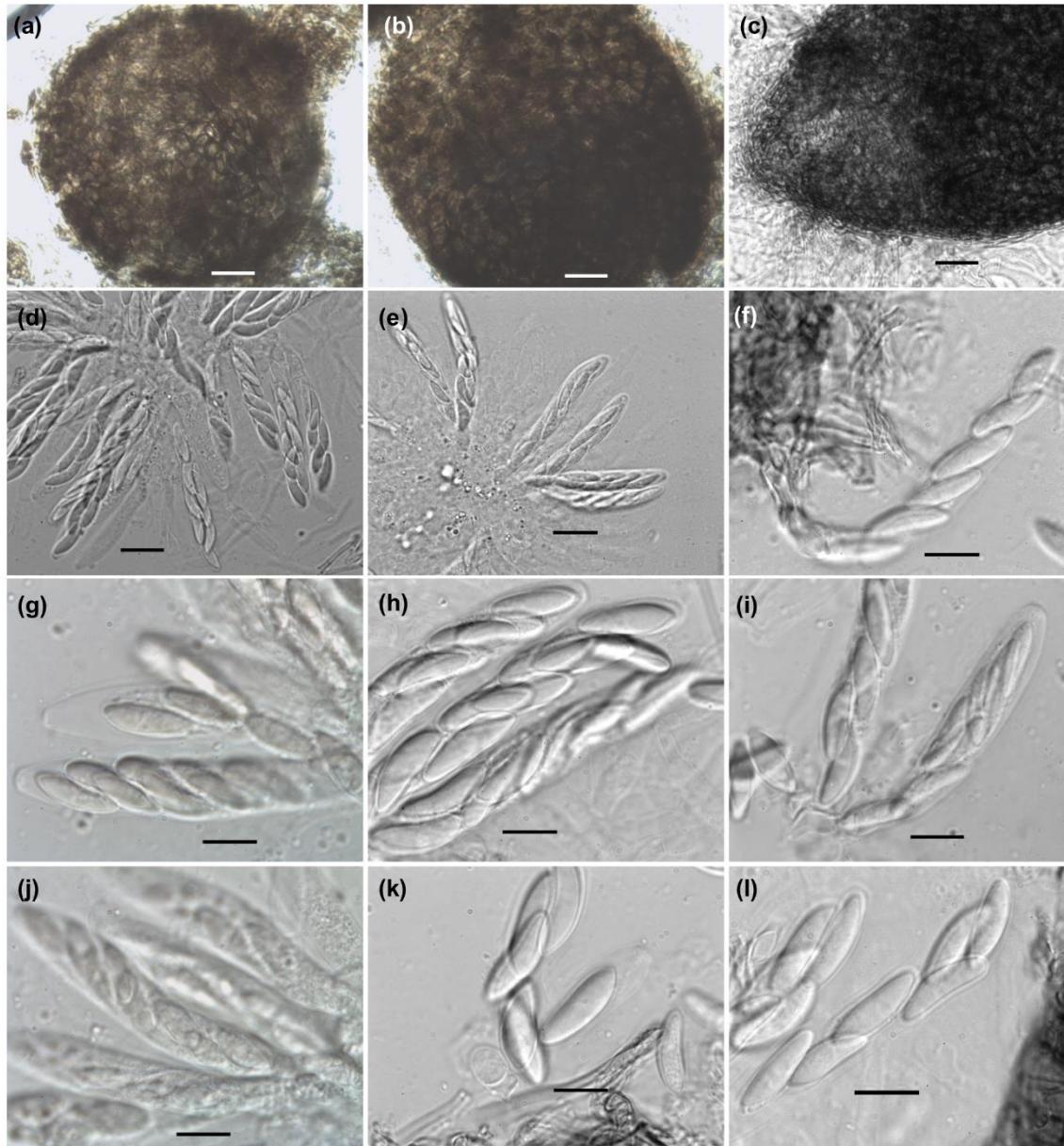


Figura 8. Características de la fase sexual de *Colletotrichum jiangxiense* cepa CPO 27.850 en medio papa dextrosa agar. Peritecios (a-c), ascas conteniendo ascosporas (d-j), ascosporas (k, l). Escala en a-e = 20 μ m y en f-l = 10 μ m.

1.5.4 Prevalencia y distribución de *Colletotrichum* spp.

Cuatro complejos de especies se encontraron en este estudio. *Colletotrichum gloeosporioides* CE presentó mayor diversidad con cinco especies (*C. siamense*, *C. chrysophilum*, *C. tropicale*, *C. cigarro* y *C. jiangxiense*); seguido de *C. acutatum* CE (*C. godetiae*, *C. fioriniae* y *C. nymphaeae*), *C. boninense* CE (*C. karsti* y *Colletotrichum* sp. 1) y *C. magnum* CE (*Colletotrichum* sp. 2). Los nuevos linajes presentaron una baja prevalencia (< 4%, $n = 232$), y solamente se encontraron en un huerto cada uno en Morelos y Puebla (Figura 9).

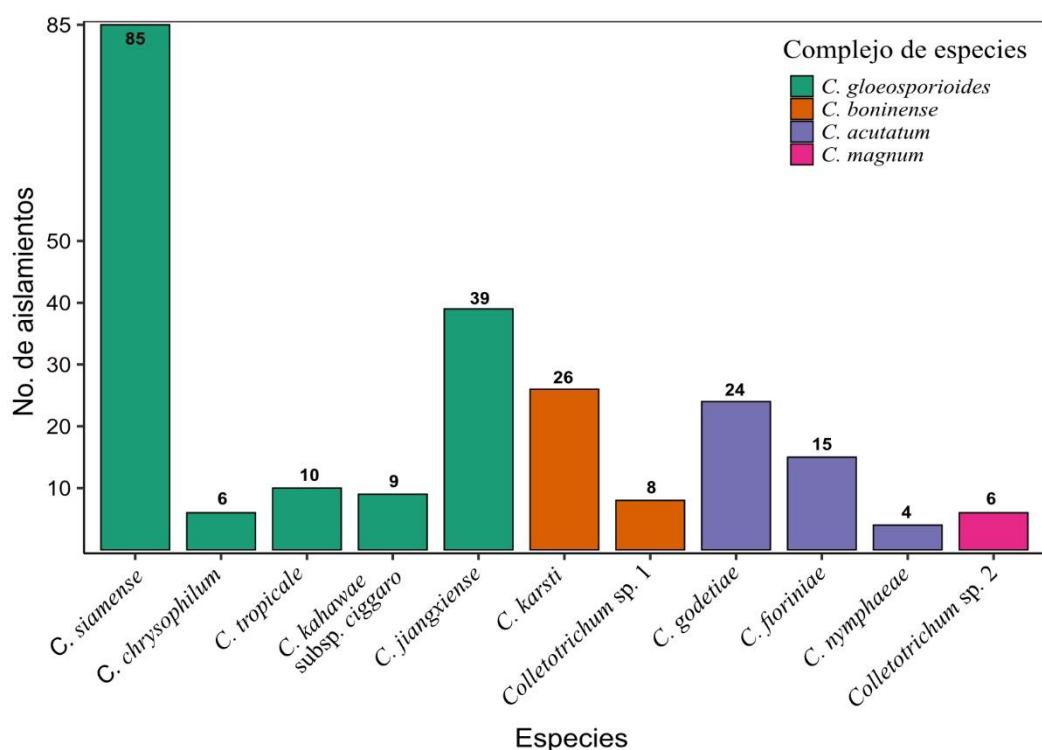


Figura 9. Prevalencia de especies de *Colletotrichum* y su correspondiente complejo de especies aisladas de frutos de aguacate con antracnosis en México ($n = 232$).

Las tres especies pertenecientes a *C. gloeosporioides* CE (*C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. tropicale*) y una a *C. acutatum* CE (*C. nymphaeae*), que representan el primer reporte en el mundo asociadas con aguacate, presentaron baja prevalencia (< 5%), a

excepción de *C. jiangxiense*, la cual ocupó el segundo lugar (16.8%) (Figura 9). *Colletotrichum siamense*, la especie más prevalente (36.6%), se aisló solamente en la región pacífico (Nayarit, Michoacán y Guerrero), seguido de *C. jiangxiense* (16.8%) aislado del pacífico y centro (Michoacán, Puebla y Morelos). *Colletotrichum karsti* tuvo la mayor distribución, encontrada en cuatro estados, mientras que *C. siamense*, *C. jiangxiense* y *C. chrysophilum* en tres regiones. En el estado de Puebla, uno de los lugares más antiguos en producción de aguacate, se presentó la mayor diversidad de especies (7 especies), incluso más que Michoacán (4 especies), el mayor productor en el país. En los estados de Guerrero y Oaxaca, con las plantaciones más jóvenes de menos de 10 años, se encontraron tres (*C. siamense*, *C. chrysophilum* y *C. tropicale*) y dos especies (*C. karsti* y *C. chrysophilum*), respectivamente. *Colletotrichum nymphaeae* y *C. fioriniae* se encontraron solamente en Puebla (Figura 10).

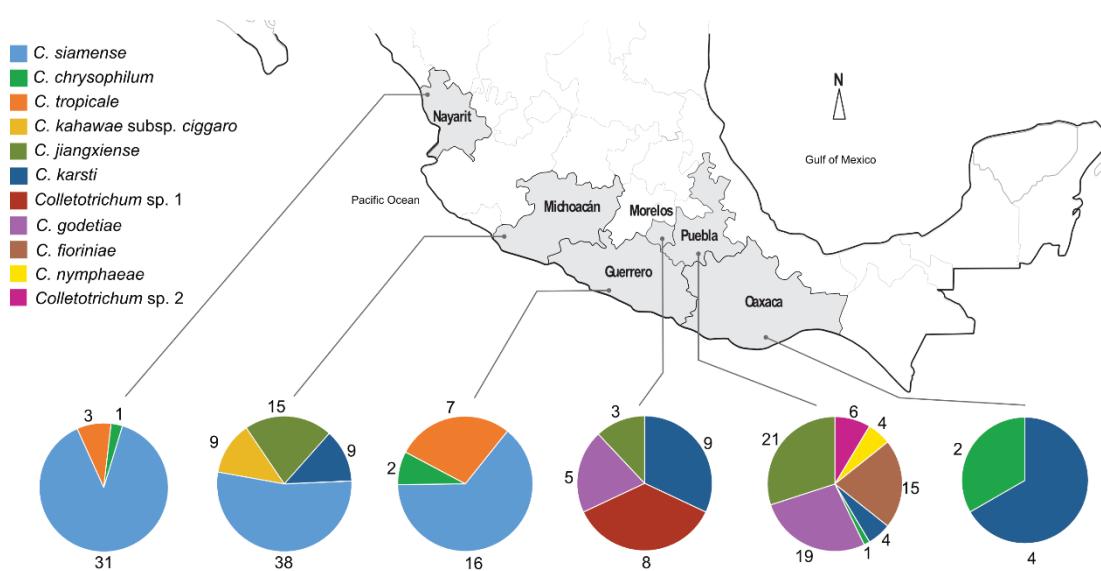


Figura 10. Mapa de distribución de 11 especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de aguacate en seis regiones productoras de México ($n = 232$)

1.5.5 Pruebas de patogenicidad

Las once especies causaron síntomas en frutos de aguacate cv. Hass, usando el método de inoculación con herida (D1=100%). Las lesiones necróticas y hundidas aparecieron desde 4 días después de la inoculación (ddi) y la calidad se vio afectada a los 7 ddi (Figura 11). El análisis de varianza y comparación de medias mostraron diferencias significativas en longitud de lesión entre especies ($p < .001$) (Figura 11). *C. tropicale*, *C. siamense*, *C. jiangxiense* y *C. chrysophilum*, miembros de *C. gloeosporioides* CE, fueron las más virulentas, causando lesiones de 29.1 a 34.6 mm, con excepción de *C. cigarro*. Además, en estas especies se observó alta esporulación en los frutos a los 7 ddi. *Colletotrichum* sp. 2 no mostró diferencias significativas con estas especies virulentas, mientras que *C. godetiae* fue la menos virulenta causando lesiones de 10.8 mm a los 7 ddi. Los nuevos linajes fueron patogénicos.

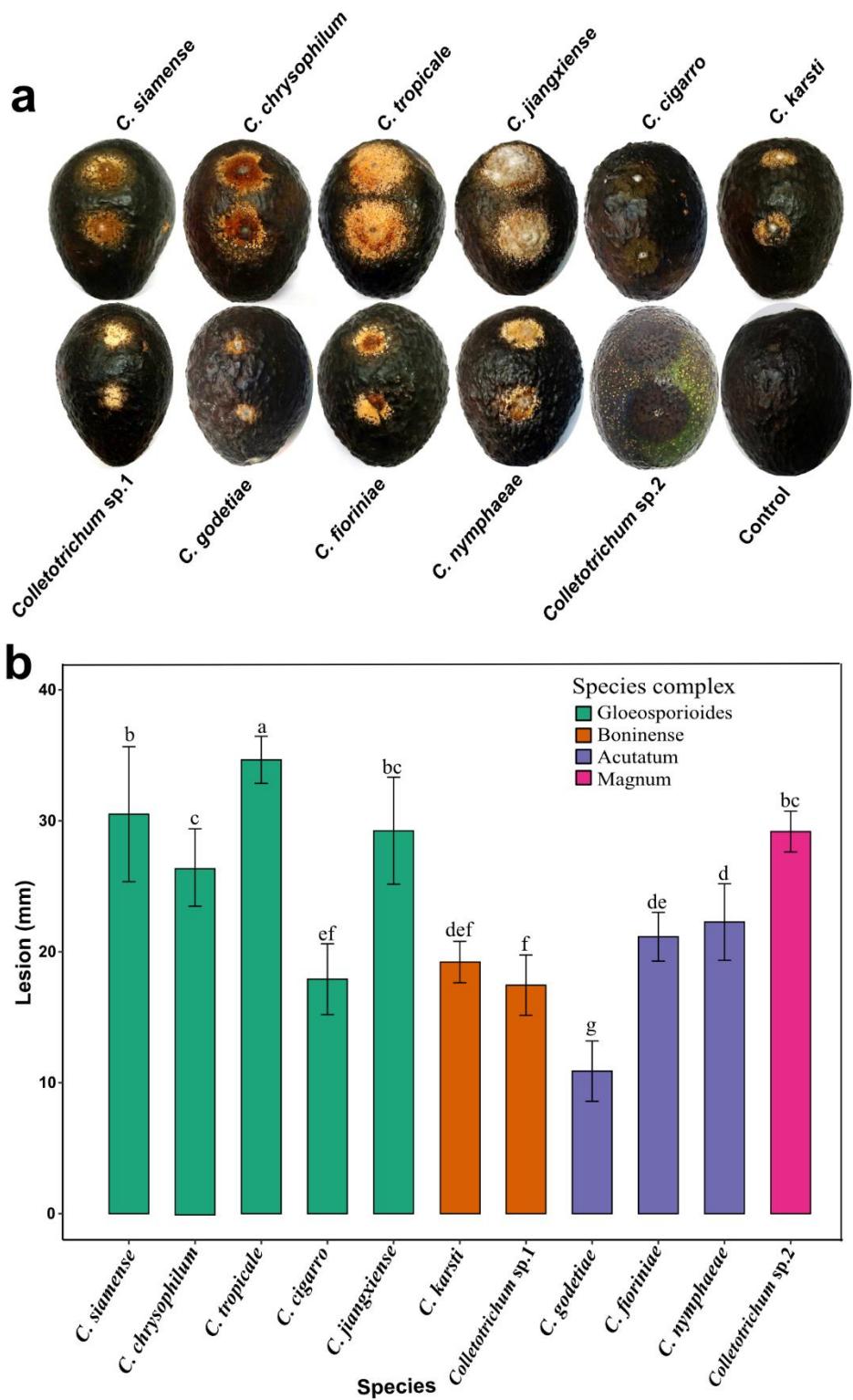


Figura 11. Pruebas de patogenicidad de 11 especies de *Colletotrichum* evaluados a los 7 días después de la inoculación. (a) Síntomas de antracnosis en cv. Hass; (b) Análisis de varianza y prueba de medias. Las mismas letras en las barras no son estadísticamente diferentes. Las líneas en las barras indican la desviación estándar.

1.6 DISCUSIÓN

La diversidad de especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis del aguacate en México, requiere un estudio más amplio con los métodos moleculares más recientes para implementar mejores estrategias de manejo. Previamente, se reportaron los complejos *C. gloeosporioides*, *C. boninense* y *C. acutatum* causando antracnosis en frutos de aguacate en México, usando solamente el análisis de la región ITS (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011), la cual no posee la suficiente resolución para delimitar las especies (Vieira *et al.*, 2020). Posteriormente, se reportó a *C. godetiae* y *C. karsti* en el estado de Morelos, usando el análisis de la región ITS y el gen *gapdh* y, por último, a *C. fructicola* aplicando el análisis filogenético multilocus (ITS, *gapdh*, *act*, *chs-1*, and *ApMat*) (Fuentes-Aragón *et al.*, 2018). Estas cepas se obtuvieron de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis colectados en regiones que no representan la completa diversidad de huertos de aguacate en México.

Se obtuvieron 232 aislamientos de 6 regiones productoras de aguacate en México, en los resultados se identificaron 11 especies distribuidas en cuatro complejos de especies: 1) *C. siamense*, *C. chrysophilum*, *C. tropicale*, *C. jiangxiense*, y *C. cigarro* perteneciente a *C. gloeosporioides* CE; 2) *C. karsti* y un nuevo linaje, llamado aquí *Colletotrichum* sp. 1, perteneciente a *C. boninense* CE; 3) *C. godetiae*, *C. fioriniae*, y *C. nymphaeae* perteneciente a *C. acutatum* CE; y 4) otro nuevo linaje nombrado *Colletotrichum* sp. 2 perteneciente a *C. magnum* CE. Solamente los complejos *C. gloeosporioides*, *C. boninense* y *C. acutatum* se han reportado causando antracnosis en aguacate en el mundo (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011; Damm *et al.*, 2012a, b; Weir *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2017). En este estudio se reporta un nuevo linaje perteneciente al complejo *C. magnum*. Además, se registra por primera vez a *C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. tropicale*, y *C. nymphaeae* causando antracnosis en aguacate en el mundo, y a *C. siamense*, *C. fioriniae*, y *C. cigarro* en México.

Colletotrichum gloeosporioides CE se conforma por 49 especies delimitadas por análisis filogenéticos y morfológicos, que incluyen especies patogénicas y endófitas en diversos hospedantes (Jayawardena *et al.*, 2016; Guarnaccia *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; De Silva *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2020). Aunque se argumenta que *C. gloeosporioides* sensu stricto es el agente causal de la antracnosis en aguacate en México (Farr y Rossman, 2020), no se identificó en el presente estudio, y solamente se ha reportado en aguacate en Israel (Sharma *et al.*, 2017).

Colletotrichum siamense se ha reportado en aguacate en Australia, Sudáfrica e Israel (Weir *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2017). Mientras que *C. cigarro* se ha identificado solamente en Nueva Zelanda y Corea el Sur (Weir *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2020), y por primera vez en México en este estudio. *Colletotrichum tropicale* se aisló y describió por primera vez de *Theobroma cacao* en Panamá por Rojas *et al.* (2010), y se ha reportado en importantes cultivos frutícolas como el mango en Brasil (Lima *et al.*, 2013) y *Annona muricata* en Panamá (Rojas *et al.*, 2010). *Colletotrichum chrysophilum* se describió recientemente causando antracnosis en banano en Brasil (Vieira *et al.*, 2017). Además, se reportó recientemente causando antracnosis en mango en México (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020). Además, otras cepas previamente identificadas como *C. fructicola* se reclasificaron como *C. chrysophilum* (Vieira *et al.*, 2017).

Colletotrichum jiangxiense se describió recientemente causando lesiones cafés en hojas de *Camellia sinensis* en China (Liu *et al.*, 2015), y como endófito en *Dendrobium* sp. en Tailandia (Ma *et al.*, 2018). Además, una cepa que se identificó como *Colletotrichum* sp. SC3A3 aislada de *Camellia sinensis* (Wang *et al.*, 2016), se agrupó en este clado. En el presente estudio, se reportó y describió por primera vez la fase sexual de *C. jiangxiense*.

Colletotrichum boninense CE está conformado por 26 especies identificadas en diferentes cultivos importantes (Jayawardena *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2018; Crous *et al.*, 2019;

Xue *et al.*, 2020), del cual solamente una especie (*C. karsti*) se ha reportado en aguacate en México, Israel y Australia (Sharma *et al.*, 2017; Giblin *et al.*, 2018). Esta especie está ampliamente distribuida en todo el mundo, causando antracnosis en importantes cultivos como *Persea americana*, *Citrus* spp., *Capsicum annuum*, *Malus domestica*, *Mangifera indica*, *Camellia* sp. y *Pistacia vera* (Farr y Rossman, 2020). Sin embargo, se encontró el nuevo linaje *Colletotrichum* sp. 1, cercano a *C. beeeveri*, causando antracnosis en frutos de aguacate.

Colletotrichum acutatum CE está conformado por 38 especies aceptadas, todas aisladas de tejido sintomático en diferentes cultivos (Jayawardena *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Cao *et al.* 2019; De Silva *et al.*, 2019; Damm *et al.*, 2020). *Colletotrichum godetiae* se ha reportado en México en aguacate, mientras que *C. fioriniae* en Australia (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015). Además, *C. godetiae* posee un amplio rango de hospedantes, infectando cultivos importantes como *Fragaria* × *ananassa*, *Malus domestica*, *Olea europaea*, *Prunus* spp. y *Vitis vinifera* en diferentes países (Damm *et al.*, 2012b). Esta especie también se ha reportado en México causando antracnosis en frutos de níspero (Juárez-Vázquez *et al.*, 2019). *Colletotrichum fioriniae* infecta *Persea americana*, *Capsicum* spp., *Carica papaya*, *Citrus* spp., *Fragaria* × *ananassa*, *Malus domestica*, *Mangifera indica*, *Pyrus communis*, *Vitis vinifera* y diversas plantas aromáticas (Guarnaccia *et al.*, 2019; Farr y Rossman, 2020). En el caso de *C. nymphaeae*, se ha reportado en *Capsicum* spp., *Fragaria* spp., *Malus domestica*, *Protea* spp., *Psidium guajava* y *Vitis vinifera* en Europa, Australia y Sudamérica (Farr y Rossman, 2020).

Colletotrichum magnum CE está conformado por nueve especies asociadas con síntomas de antracnosis (Damm *et al.*, 2019). En el presente estudio, *Colletotrichum* sp. 2 se consideró como un nuevo linaje perteneciente al complejo *C. magnum*. Este linaje es

cercano a *Colletotrichum* sp. COUFAL 7300 y Q026, aislados de *Sechium edule* y *Citrus medica* en Brasil y China, respectivamente (Peng *et al.*, 2012; Bezerra *et al.*, 2016).

Las características culturales y morfológicas variaron entre especies de *Colletotrichum*. Solamente la forma de los conidios pudo distinguir entre complejo *C. gloeosporioides*, *C. boninense* y *C. acutatum*, con la excepción de *C. magnum*, que fue similar a *C. gloeosporioides*. La forma de los conidios fue similar como se reportó por Weir *et al.* (2012) y Damm *et al.* (2012a, b; Damm *et al.*, 2019). El tamaño y forma de los conidios y apresorios no fueron consistentes para todas las especies dentro de cada complejo. Además, la fase sexual no se desarrolla para todas las especies en condiciones de laboratorio (Weir *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012a, b; Damm *et al.*, 2019); por lo tanto, las características morfológicas no se pueden utilizar para la delimitación de las especies. Se observó la fase sexual en PDA de las especies *C. jiangxiense*, *C. chrysophilum*, y *C. karsti*, mostrando características similares reportadas en otros estudios (Damm *et al.*, 2012a; Vieira *et al.*, 2017), a excepción de *C. jiangxiense*, que se reportó por primera vez en este estudio.

La identificación precisa de especies fúngicas es crucial para el monitoreo de los patógenos cuarentenados. Por ejemplo, Waller *et al.* (1993) introdujo como nueva especie a *C. kahawae* infectando frutos de café. Después, se propusieron dos subespecies debido a la importancia de bioseguridad del patógeno en este hospedante: *C. kahawae* subsp. *kahawae*, afectando al cafeto y *C. kahawae* subsp. *cigarro* con un amplio rango de hospedantes (Weir *et al.*, 2012). Aunque estas especies presentan las mismas secuencias en ITS, *gapdh*, *act*, *chs-1*, *tub2*, y *sod2*, se pueden distinguir con base en la secuencia del *gs*, debido a una delección de 22 pb (Weir *et al.*, 2012). *C. kahawae* también se distingue metabólicamente, por la habilidad de *C. kahawae* de utilizar fuentes específicas de carbono (Waller *et al.*, 1993). Recientemente, las dos subespecies se subieron al nivel especie usando un enfoque polifásico, incluyendo datos patológicos, morfológicos, citogenómicos, bioquímicos y

moleculares (Cabral *et al.*, 2020). Otro ejemplo es *C. siamense*, el cual se consideró como complejo de especies, formado por *C. communis*, *C. dianesei*, *C. endomangiferae*, *C. hymenocallidis*, *C. jasmini-sambac*, *C. melanocaulon* y *C. murrayae* (Sharma *et al.*, 2015), debido a la alta diversidad genética y variabilidad morfológica. Estas putativas especies, se sinonimizaron con *C. siamense* utilizando el criterio GCPSR y métodos coalescentes (Liu *et al.*, 2016).

El análisis de la distribución mostró que algunas especies se encontraron en una región y en otra no. Las especies que se reportaron por primera vez en aguacate, incluyendo los dos nuevos linajes, se obtuvieron con una baja frecuencia, al contrario de lo reportado por Sharma *et al.* (2017), quienes encontraron la nueva especie (*C. perseae*) como la más prevalente en aguacate en Israel. Una alta diversidad de *Colletotrichum* se encontró en el estado de Puebla, con siete especies (*C. chrysophilum*, *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. cigarro*, *C. karsti*, *C. nymphaeae*, and *Colletotrichum* sp. 2). Lo anterior puede deberse a dos razones. Primero, Puebla se considera el centro de origen del aguacate con los reportes más antiguos alrededor de 7000-8000 A.C. (Smith, 1966) y, segundo, una coevolución probable con *Colletotrichum*. El patosistema *Colletotrichum*-hospedante ocurre en diversos cultivos frutícolas como pera (*Pyrus* sp.), manzana (*Malus domestica*) y durazno (*Prunus* sp.). En el 2018, el estado de Puebla ocupó el primero, segundo y cuarto lugar en producción de pera, manzana y durazno, respectivamente. Estos cultivos frecuentemente son afectados por la antracnosis causada por *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. karsti*, *C. nymphaeae* y *C. siamense* en otros países (Farr y Rossman, 2020). Esta hipótesis se soporta con la demostración de patogenicidad cruzada de *Colletotrichum* en diferentes hospedantes. Estudios futuros se deben enfocar en la diversidad genética de este patógeno en otros cultivos de importancia económica para México.

Todas las especies causaron síntomas en las pruebas de patogenicidad en frutos de aguacate cv. Hass, y los miembros de *C. gloeosporioides* CE fueron los más virulentos (*C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. siamense* y *C. tropicale*). Sin embargo, *Colletotrichum* sp. 2 tuvo virulencia similar. Interesantemente, no se desarrollaron síntomas en la inoculación de frutos sin herida. Resultados similares se obtuvieron de nueve especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis del aguacate en Israel (Sharma *et al.*, 2017). Esta ausencia de síntomas requiere estudios subsecuentes.

En conclusión, este estudio elucida la diversidad de especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis de frutos de aguacate en México. Once especies se identificaron causando antracnosis en los frutos, incluyendo dos nuevos linajes. Seis especies se reportaron por primera vez en aguacate y tres especies por primera vez en México. Además, se clarificó la distribución y patogenicidad de las especies encontradas. Todas las especies reportadas en este estudio no representan ningún riesgo para los países importadores y productores de aguacate, debido a que estas especies están ampliamente distribuidas en el mundo en un amplio rango de hospedantes. Además, los frutos con síntomas se descartan para exportación desde la cosecha y empacamiento. La consideración de la diversidad de especies ayudará a los productores a adoptar mejores estrategias de manejo. Las futuras investigaciones se deben enfocar en la evaluación de la sensibilidad de fungicidas autorizados para la aplicación en aguacate en México.

1.7 LITERATURA CITADA

- Bezerra, J. P., P. V. Ferreira, L. F. Barbosa, R. Ramos-Sobrinho, and D. B. Pinho. 2016. First report of anthracnose on chayote fruits (*Sechium edule*) caused by *Colletotrichum brevisporum*. *Plant Dis.* 100:217.
- Bragança, C. A. D., U. Damm, R. Baroncelli, N. S. Massola Júnior, and P. W. Crous. 2016. Species of *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. *Fungal Biol.* 120:547–561.
- Cabral, A., H. G. Azinheira, P. Talhinas, D. Batista, A. P. Ramos, M. do Céu Silva, H. Oliveira, and V. Várzea. 2020. Pathological, morphological, cytogenomic, biochemical, and molecular data support the distinction between *Colletotrichum cigarro* comb. et stat. nov. and *Colletotrichum kahawae*. *Plants* 9:502.
- Cabrera, L., P. Rojas, S. Rojas, C. J. Pardo-De la Hoz, M. F. Mideros, et al. 2018. Most *Colletotrichum* species associated with tree tomato (*Solanum betaceum*) and mango (*Mangifera indica*) crops are not host-specific. *Plant Pathol.* 67:1022–1030.
- Cao, X., X. Xu, H. Che, J. S. West, D. and D. Luo. 2019. Three *Colletotrichum* species, including a new species, are associated to leaf anthracnose of rubber tree in Hainan, China. *Plant Dis.* 130:117–124.
- Cao, X., X. Xu, H. Che, J. S. West, and D. Luo. 2020. Eight *Colletotrichum* species, including a novel species, are associated with areca palm anthracnose in Hainan, China. *Plant Dis.* 104:1369–1377.
- Carbone, I., and L. M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556.
- Crous, P. W., A. J. Carnegie, M. J. Wingfield, R. Sharma, G. Mughini, et al. 2019. Fungal Planet description sheets. *Persoonia* 42:291–473.
- Crous, P. W., J. Z. Groenewald, J. M. Risède, P. Simoneau, and N. L. Hywel-Jones. 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Stud. Mycol.* 50:415–430.
- Damm, U., P. F. Cannon, J. H. Woudenberg, P. R. Johnston, B. S. Weir, et al. 2012a. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Stud. Mycol.* 73:1–36.
- Damm, U., P. F. Cannon, J. H. Woudenberg, and P. W. Crous. 2012b. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73:37–113.
- Damm, U., T. Sato, A. Alizadeh, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2019. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. *Stud. Mycol.* 92:1–46.
- Damm, U., Y. C. Sun, and C. J. Huang. 2020. *Colletotrichum eriobotryae* sp. nov. and *C. nymphaeae*, the anthracnose pathogens of loquat fruit in central Taiwan, and their sensitivity to azoxystrobin. *Mycol. Prog.* 19:367–380.
- Dann, E. K., R. C. Ploetz, L. M. Coates, and L. G. Pegg. 2013. Foliar, fruit and soilborne diseases. In: Schaffer, B., Wolstenholme, B.N. and Whiley, A.W. (Eds.). *The Avocado. Botany, Production and Uses*. Second Edition. Oxfordshire, UK: CAB International, pp. 380–422.

- De Silva, D. D., J. Z. Groenewald, P. W. Crous, P. K. Ades, A. Nasruddin, O. Mongkolporn, and P. W. J. Taylor. 2019. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. IMA Fungus 10:8.
- Dean, R., J. A. L. Van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, *et al.* (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13:414–430.
- Diao, Y. Z., C. Zhang, F. Liu, W. Z. Wang, L. Liu, L. Cai, and X. L. Liu. 2017. *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of chili in China. Persoonia 38:20–37.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13–15.
- Farr, D. F., and A. Y. Rossman. 2020. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Available at: <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> [Accessed 3 March 2020].
- Fuentes-Aragón, D., S. B. Juárez-Vázquez, M. Vargas-Hernández, and H. V. Silva-Rojas. 2018. *Colletotrichum fructicola*, a member of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. Hass. Mycobiology 46:92–100.
- Fuentes-Aragón, D., V. Guarnaccia, A. Rebollar-Alviter, S. B. Juárez-Vázquez, F. Aguirre-Ray, and H. V. Silva-Rojas. 2020. Multilocus identification and thiophanate-methyl sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex associated with fruit with symptoms and symptomless leaves of mango. Plant Pathol. 69:1125–1138.
- Giblin, F. R., Y. P. Tan, R. Mitchell, L. M. Coates, J. A. C. Irwin, and R. G. Shivas. 2018. *Colletotrichum* species associated with pre- and post-harvest diseases of avocado and mango in eastern Australia. Austral. Plant Pathol. 47:269–276.
- Guarnaccia, V., G. Gilardi, I. Martino, A. Garibaldi, and M. L. Gullino. 2019. Species diversity in *Colletotrichum* causing anthracnose of aromatic and ornamental Lamiaceae in Italy. Agronomy 9:613.
- Guarnaccia, V., J. Z. Groenewald, G. Polizzi, and P. W. Crous. 2017. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. Persoonia 39:32–50.
- Guarnaccia, V., M. Sandoval-Denis, D. Aiello, G. Polizzi, and P. W. Crous. 2018. *Neocosmospora perseae* sp. nov., causing trunk cankers on avocado in Italy. Fungal Syst. Evol. 1:131–140.
- Guarnaccia, V., A. Vitale, G. Cirvilleri, D. Aiello, A. Susca, F. Epifani, G. Perrone, and G. Polizzi. 2016. Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. Eur. J. Plant Pathol. 146:963–976.
- Guerber, J. C., B. Liu, J. C. Correll, and P. R. Johnston. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. Mycologia 95:872–895.
- Hernández-Lauzardo, A. N., A. Campos-Martínez, M. G. Velázquez-del Valle, H. E. Flores-Moctezuma, R. Suárez-Rodríguez, and J. A. Ramírez-Trujillo. 2015. First report of *Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on avocado in Mexico. Plant Dis. 99:555.

- Huson, D. H., and D. Bryant. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23:254–267.
- Jayawardena, R. S., K. D. Hyde, U. Damm, L. Cai, M. Liu, *et al.* 2016. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7:1192–1260.
- Juárez-Vázquez, S. B., H. V. Silva-Rojas, A. Rebollar-Alviter, M. Maidana-Ojeda, M. Osnaya-González, and D. Fuentes-Aragón. 2019. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum godetiae*, a novel pathogen causing anthracnose on loquat fruits (*Eriobotrya japonica*). *J. Plant Dis Protect.* 126:593–598.
- Katoh, K., and D. M. Standley. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30:772–780.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, *et al.* 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649.
- Kwon, J. H., O. Choi, Y. Lee, S. Kim, B. Kang, and J. Kim. 2020. Anthracnose on postharvest avocado caused by *Colletotrichum kahawae* subsp. *cigarro* in South Korea. *Canadian J. Plant Pathol.* In Press.
- Leigh, J. W., and D. Bryant. 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Met. Ecol. Evol.* 6:1110–1116.
- Lima, N. B., M. V. de A. Batista, M. A. De Morais Jr, M. A. G. Barbosa, and S. J. Michereff. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Divers.* 61:75–88.
- Liu, F., B. S. Weir, U. Damm, P. W. Crous, and Y. Wang. 2015. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing *ApMat* and *GS* loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia* 35:63–86.
- Liu, F., M. Wang, U. Damm, P. W. Crous, and L. Cai. 2016. Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. *BMC Evol. Biol.* 16:81.
- Liu, X., B. Li, J. Cai, X. Zheng, Y. Feng, and G. Huang. 2018. *Colletotrichum* species causing anthracnose of rubber trees in China. *Sci. Rep.* 8:10435.
- Ma, X., S. Nontachaiyapoom, R. S. Jayawardena, K. D. Hyde, and E. Gentekaki. 2018. Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand. *MycoKeys* 43:23–57.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- O'Donnell, K., and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7:103–116.
- Peng, L., Y. Yang, K. D. Hyde, A. H. Bahkali, and Z. Liu. 2012. *Colletotrichum* species on *Citrus* leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Cryptogamie, Mycologie* 33:267–283.

- Quaedvlieg, W., M. Binder, J. Z. Groenewald, B. A. Summerell, A. L. Carnegie, T. I. Burgess, and P. W. Crous. 2014. Introducing the consolidated species concept to resolve species in the Teratosphaeriaceae. *Persoonia* 33:1–40.
- Rojas, E. I., S. A. Rehner, G. J. Samuels, S. A. Van Bael, E. A. Herre, P. Cannon, R. Chen, *et al.* 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. associated with *Theobromae cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish pathogen and endophytes clades. *Mycologia* 102:1318–1338.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, *et al.* 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61:539–542.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-Del Barrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, E. E. Ramos-Onsis, and A. Sánchez-Gracia, 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34:3299–3302.
- SADER (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Panorama Agroalimentario. Available at: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019. [Accessed 28 January 2020].
- Sharma, G., N. Kumar, B. S. Weir, K. D. Hyde, and B. D. Shenoy. 2013. The *ApMat* marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Divers.* 61:117–138.
- Sharma, G., A. K. Pinnaka, and B. D. Shenoy. 2015. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using *ApMat* marker. *Fungal Divers.* 71:247–264.
- Sharma, G., M. Maymon, and S. Freeman. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Sci. Rep.* 7:15839.
- Silva-Rojas, H.V., and G. D. Ávila-Quezada. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathol.* 60:899–908.
- Silva, D. N., P. Talhinhas, and V. Várzea. 2012. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia* 104:396–409.
- Smith, C. E. J. 1966. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Bot.* 20:169–175.
- Stephenson, S. A., J. R. Green, and J. M. Manners. 1997. Cloning and characterisation of glutamine synthetase from *Colletotrichum gloeosporioides* and demonstration of elevated expression during pathogenesis on *Stylosanthes guianensis*. *Current Genet.* 31:447–454.
- Swofford, D. L. 2003. *PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony. Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Taylor, J. W., D. J. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D. M. Geiser, D. S. Hibbet, and M. C. Fisher. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 31:21–32.

- Velázquez-del Valle, M. G., A. Campos-Martínez, H. E. Flores-Moctezuma, R. Suárez-Rodríguez, J. A. Ramírez-Trujillo, and A. N. Hernández-Lauzardo. 2016. First report of avocado anthracnose caused by *Colletotrichum karsti* in Mexico. Plant Dis. 100:534.
- Vieira, W. A. S., W. G. Lima, E. S. Nascimento, S. J. Michereff, M. P. S. Câmara, and V. P. Doyle. 2017. The impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity associated with *Musa*. Mycologia 109:912–934.
- Vieira W. A. S., P. A. Bezerra, A. C. Silva, J. S. Veloso, M. P. S. Câmara, and V. P. Doyle. 2020. Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. Mol. Phylogenet. Evol. 143:106694.
- Waller, J. M., P. D. Bridge, R. Black, and G. Hakiza. 1993. Characterisation of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. Mycol. Res. 97:989–994.
- Wang, Y. C., X. Y. Hao, L. Wang, B. Xiao, X. Wang, and Y. J. Yang. 2016. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. Sci. Rep. 6:35287.
- Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Stud. Mycol. 73:115–180.
- White, T. J., T. Bruns, and J. Lee. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. California, USA: Academic Press, pp. 315–322.
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Second Edition. New York, USA: Springer-Verlag.
- Xue, L., Y. Zhang, T. Duan, M. Li, J. F. White, Y. Liu, and C. Li. 2020. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species on *Philodendron tatei* cv. Congo in Gansu Province, China. Plant Dis. In Press.
- Yang, Y. L., Z. Y. Liu, L. Cai, K. D. Hyde, Z. N. Yu, and E. H. C. McKenzie. 2009. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. Fungal Divers. 39:123–146.

**CAPITULO II. SENSIBILIDAD *in vitro* A TIABENDAZOL Y AZOXISTROBIN DE
Colletotrichum spp. CAUSANTES DE ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE
AGUACATE**

2.1 RESUMEN

Colletotrichum spp. causan la antracnosis en frutos de aguacate en las principales regiones productoras de México. En cada ciclo de producción se presentan epidemias que merman significativamente la producción y calidad de los frutos. En los huertos con manejo convencional, se aplican únicamente fungicidas autorizados para el control de la enfermedad. Sin embargo, la emergencia de epidemias recientes puede deberse a la aparición de poblaciones resistentes a los fungicidas comúnmente aplicados. El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* la sensibilidad de once especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de aguacate (*C. siamense*, *C. tropicale*, *C. chrysophilum*, *C. cigarro*, *C. karsti*, *Colletotrichum* sp. 1, *C. godetiae*, *C. fioriniae*, *C. nymphaeae* y *Colletotrichum* sp. 2) a tiabendazol (TI) y azoxistrobin (AZ). Los resultados mostraron alta sensibilidad a TI en las once especies evaluadas, con valores de $CE_{50}<0.4\text{ mg L}^{-1}$ y $CE_{95}<2\text{ mg L}^{-1}$, mientras que siete especies (*C. siamense*, *C. chrysophilum*, *C. tropicale*, *C. jiangxiense*, *C. karsti*, *C. fioriniae* y *C. nymphaeae*) fueron altamente resistentes a AZ, con valores de $CE_{50}>1000\text{ mg L}^{-1}$. Las especies remanentes (*C. cigarro*, *Colletotrichum* sp. 1 y 2, y *C. godetiae*) fueron sensibles a azoxistrobin con valores de $CE_{50}<0.1\text{ mg L}^{-1}$. Ambos fungicidas indujeron hormesis sobre el crecimiento micelial de *C. siamense* (TI y AZ), *C. tropicale* (AZ), *C. jiangxiense* (AZ), *C. karsti* (AZ), *C. chrysophilum* (TI) y *C. cigarro* (TI), con dosis baja para TI (0.3 mg L^{-1}) y dosis baja (0.03 mg L^{-1}) y alta para AZ (1000 mg L^{-1}). Estos resultados sugieren que el tiabendazol sigue siendo una opción para el control de la antracnosis; mientras que el uso de azoxistrobin debe ser limitado.

Palabras clave: Resistencia, hormesis, benzimidazoles, estrobilurinas

2.2 ABSTRACT

Colletotrichum spp. cause anthracnose of avocado fruits in the main producer regions in Mexico. In each production cycle, epidemics emerge in most orchards decreasing the fruit production and quality. Authorized fungicides are applied in the conventional orchards for anthracnose management. Nevertheless, epidemics emergence, may be due to the appearance of fungicide resistant populations to common applied fungicides. This study aimed to evaluate the thiabendazole (TH) and azoxystrobin (AZ) sensitivity *in vitro* of eleven *Colletotrichum* species causing avocado anthracnose (*C. siamense*, *C. tropicale*, *C. chrysophilum*, *C. cigarro*, *C. karsti*, *C. godetiae*, *C. fioriniae*, *C. nymphaeae*, *Colletotrichum* sp. 1 and *Colletotrichum* sp. 2). The results showed in the all eleven *Colletotrichum* species were highly sensitive to thiabendazole, with values of $CE_{50}<0.4\text{ mg L}^{-1}$ and $CE_{95}<2\text{ mg L}^{-1}$, while seven species (*C. siamense*, *C. chrysophilum*, *C. tropicale*, *C. jiangxiense*, *C. karsti*, *C. fioriniae* y *C. nymphaeae*) were highly resistant to azoxystrobin with values of $CE_{50}>1000\text{ mg L}^{-1}$. The remaining four species (*C. cigarro*, *Colletotrichum* sp. 1 y 2, and *C. godetiae*) were highly sensitive to azoxystrobin with values of $CE_{50}<0.1\text{ mg L}^{-1}$. Both fungicides induced hormetic effects on mycelial growth of *C. siamense* (TH y AZ), *C. tropicale* (AZ), *C. jiangxiense* (AZ), *C. karsti* (AZ), *C. chrysophilum* (TH) y *C. cigarro* (TH), with low doses for thiabendazole (0.1 mg L^{-1}) and low (0.03 mg L^{-1}) and high doses (1000 mg L^{-1}) for azoxystrobin. These results suggest that thiabendazole continue being an option for anthracnose management, while application of azoxystrobin should be limited.

Keywords: Resistance, hormesis, benzimidazole, strobilurins

2.3 INTRODUCCIÓN

Colletotrichum spp. causa la antracnosis en una amplia diversidad de cultivos de importancia económica en todo el mundo. En el aguacate, la antracnosis en pre y postcosecha constituye el principal problema en los países productores. Once especies de *Colletotrichum* identificadas mediante análisis filogenéticos se han asociado a la antracnosis del aguacate en México, (Silva-Rojas y Ávila-Quezada 2011; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015; Velázquez-del Valle *et al.*, 2016; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018).

La aplicación de fungicidas en campo para el manejo de la antracnosis en aguacate es una estrategia crucial para asegurar la buena calidad y la comercialización de los frutos. Sin embargo, el uso continuo de fungicidas y el desconocimiento del manejo de la resistencia, han generado poblaciones resistentes a benzimidazoles en aislamientos de *C. gloeosporioides* (Tashiro *et al.*, 2012, Lin *et al.*, 2016), *C. truncatum* (Torres-Calzada *et al.*, 2015) y *C. siamense* (Fuentes-Aragón *et al.*, 2020); a estrobilurinas en *C. acutatum* (Forcelini *et al.*, 2016) y *C. siamense* (Hu *et al.*, 2015); así como a triazoles en *C. truncatum* y *C. nymphaeae* (Zhang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). La resistencia a fungicidas en hongos se ha correlacionado con mutaciones puntuales en el sitio de acción de los ingredientes activos. Por ejemplo, los aislamientos resistentes a benzimidazoles presentan mutaciones puntuales en el gen β -tubulina (Koenraadt *et al.*, 1992; Maymon *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2010a,b; Lin *et al.*, 2016) y los resistentes a estrobilurinas, en el gen citocromo b (Sierotzki *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2015). Sin embargo, estas mutaciones no son consistentes en todos los aislamientos y especies de *Colletotrichum*. Diversos estudios también han demostrado alta resistencia en poblaciones de *Colletotrichum* a benzimidazoles, estrobilurinas y triazoles, las cuales no poseen mutación en las proteínas del sitio de acción de cada fungicida (Baggio *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020).

En el caso de los fungicidas inhibidores de la respiración celular, se ha detectado en estudios *in vitro* que inducen la activación de la oxidasa alternativa en la membrana mitocondrial, permitiendo el crecimiento fúngico en medio de cultivo suplementado con fungicida (Wood y Hollomon, 2003). El ácido salicilhidroxámico (SHAM) es un compuesto que bloquea esta ruta alterna de respiración celular, por lo tanto, se ha utilizado en estudios *in vitro* en diferentes hongos fitopatógenos, incluyendo al género *Colletotrichum* (Young *et al.*, 2010a, b; Chechi *et al.*, 2019; Damm *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020). En estudios *in vitro* con *C. acutatum*, *C. truncatum* y *C. graminicola* se han encontrado poblaciones que no presentan diferencias respecto a la adición o no de SHAM (Avila-Adame *et al.*, 2003; Torres-Calzada *et al.*, 2015; Forcelini *et al.*, 2016; Baggio *et al.*, 2018), sugiriendo que estos aislamientos no utilizan la ruta alterna de la respiración celular. Por otra parte, también se ha detectado que el SHAM tiene efecto tóxico en algunos hongos fitopatógenos, con los cuales no puede utilizarse para estudios *in vitro* (Price *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2019).

Se desconoce la sensibilidad a fungicidas de las poblaciones de *Colletotrichum* en aguacate en México. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad de 11 especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de aguacate en México al tiabendazol y azoxistrobin, que difieren en mecanismo de acción.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Aislamientos

Se evaluaron aislamientos representativos de 11 especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis en frutos de aguacate ‘Hass’, previamente identificadas mediante análisis filogenético como se mencionó en el Capítulo II.

2.4.2 Sensibilidad *in vitro* a fungicidas sobre el crecimiento micelial

Se evaluaron concentraciones previamente definidas con base en ventanas biológicas de los ingredientes activos (i. a.) de tiabendazol y azoxistrobin, ambos recomendados por la Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México (APEAM). La evaluación se hizo con un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Las unidades experimentales constaron de una caja Petri con 15 mL de PDA suplementado con cada uno de los dos fungicidas a diferente concentración. Se prepararon soluciones madre de cada fungicida en agua destilada esterilizada, los cuales se agregaron al medio PDA esterilizado y a una temperatura de 50 °C. Cajas Petri con medio sin la adición de fungicidas se consideraron como controles. Discos de micelio (7 mm de diámetro) se extrajeron del margen de cada colonia en activo crecimiento en PDA y se colocaron en el centro de las cajas Petri con PDA con el fungicida. Posteriormente, se incubaron en oscuridad a 25 °C por 5 días. Se midió el diámetro en dos direcciones ortogonales con la ayuda de un vernier, sustrayendo el diámetro del disco de PDA inoculado.

Para el caso del inhibidor de la respiración celular (azoxistrobin), se realizó un experimento para determinar el efecto del ácido salicilhidroxámico (SHAM, Sigma Aldrich) en la inhibición de la ruta alterna de la respiración celular (Tanton *et al.*, 2003) que se ha reportado en diversos estudios *in vitro*. El azoxistrobin y el SHAM se disolvieron en agua para formar soluciones madre; posteriormente, se agregó al medio PDA (a 50 °C) después de la esterilización. Se evaluaron concentraciones de i.a. a 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 1, 10 y 1000 mg L⁻¹, más la correspondiente cantidad de SHAM para obtener una concentración final de 100 mg L⁻¹. En las pruebas previas se observaron diferencias en el crecimiento micelial en ausencia y presencia de SHAM, por lo que todas las evaluaciones se realizaron con la adición de este compuesto.

2.4.3 Análisis de datos

Se calcularon las concentraciones efectivas en las cuales se reducía el 50% del crecimiento micelial (CE50), utilizando los datos del crecimiento relativo para cada concentración (diámetro de la colonia en el tratamiento con fungicida / media de los diámetros de las repeticiones del control × 100). Los cálculos se realizaron mediante regresión no lineal del crecimiento relativo de las colonias contra la transformación logarítmica de las concentraciones del i.a., utilizando el paquete estadístico “drc” (Ritz y Streibig, 2015) implementado en R (R Core Team). Previamente, se evaluaron modelos no horméticos [log logístico con cuatro parámetros (“LL.4”), log logístico con tres parámetros (“LL.3”), y Weibull2 con cuatro parámetros (“W2.4”)] (Ritz *et al.*, 2015) y horméticos [Brain y Cousens (“BC.4”), Cedergreen-Ritz-Streibig (“CRS.4b”)] (Brain y Counses, 1989; Cedergreen *et al.*, 2005) para calcular el mejor ajuste a los datos utilizando la opción “drm” en “drc”. El modelo seleccionado con mayor ajuste a los datos, se utilizó con base en el menor valor del Criterio de Información de Akaike, el mayor valor de Verosimilitud logarítmica, suma de cuadrados de los residuales y la falta de ajuste, calculados con la función “mselect” en “drc”.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la sensibilidad a tiabendazol y azoxistrobin de las 11 especies de *Colletotrichum* identificadas en el Capítulo II. En general, todas las especies fueron sensibles a tiabendazol, pero no a azoxistrobin, al cual mostraron resistencia alta algunas especies.

Para el caso del tiabendazol, las CE₅₀ y CE₉₅ fueron menores a 0.30 y 1.5 mg L⁻¹, respectivamente (Cuadro 1). Estos valores fueron menores en comparación con otros estudios. Por ejemplo, Torres-Calzada *et al.* (2015) determinaron valores de CE₅₀ de 6.6 a 2673 mg L⁻¹ en aislamientos de *C. truncatum* obtenidos de papaya y chile, demostrando alta resistencia a tiabendazol. Aislamientos de *C. gloeosporioides* de mango fueron altamente

resistentes, con CE₅₀ de 5 a 916 mg L⁻¹ (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003). Aunque el tiabendazol se comercializó a partir de 1964 por Merck™, empresa adquirida por Syngenta en 1997 (Maienfisch y Edmunds, 2017), aún se sigue distribuyendo, recomendándose la aplicación de este fungicida para el control de la antracnosis en aguacate, mango, plátano, papayo, fresa y soya; sin embargo, la emergencia de resistencia a este fungicida en México y en el mundo, no se ha estudiado ampliamente. Aunque se aplica constantemente en aguacate, no se detectaron poblaciones resistentes, posiblemente debido a que las probables poblaciones resistentes se encuentran en baja frecuencia y, por lo tanto, se detectan con dificultad en el muestreo. También es posible que ha sido eficiente el manejo de la resistencia a este fungicida. La sensibilidad y/o resistencia al tiofanato-metílico, otro benzimidazol, en especies de *Colletotrichum* se ha estudiado más ampliamente. En México, Epinoza-Altamirano *et al.* (2017) evaluaron cepas del complejo *C. acutatum* de fresa, mientras que Fuentes-Aragón *et al.* (2020) detectaron alta resistencia a este fungicida en cepas del complejo *C. gloeosporioides* de mango. No se observó evidencia de resistencia cruzada de tiabendazol con otros fungicidas en especies de *Colletotrichum*, por lo tanto, sigue siendo una opción para el control de la antracnosis en aguacate.

Para el caso de ajuste de los datos a los modelos no lineales, se observó que los modelos más comunes fueron el LL.4 y W2.4, aunque también hubo datos que se ajustaron a los modelos horméticos (BC.4 para *C. siamense* y CRS.4b para *C. chrysophilum* y *C. cigarro*), mostrando estimulación en el crecimiento a dosis bajas de 0.1 mg L⁻¹ (Figura 1). Este es el primer registro del efecto hormético del tiabendazol en especies de *Colletotrichum*. Este efecto ya se había demostrado con tiofanato-metílico en el complejo *C. gloeosporioides* obtenidos de mango y en otros hongos fitopatógenos (Pradhan *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020). Algunas cepas dentro del complejo *C. acutatum* mostraron un ligero crecimiento a partir de 1 mg L⁻¹, el cual se estabilizó en concentraciones subsecuentes hasta

10 mg L⁻¹ (Figura 2). Sin embargo, hasta el momento no había reportes de este fenómeno en especies de *Colletotrichum*, por lo tanto, se requieren más estudios para elucidar la estabilización de la sensibilidad en concentraciones más altas.

Cuadro 1. Concentraciones efectivas (CE), modelos de ajuste para el cálculo de CE y parámetros de selección de los modelos para la sensibilidad a tiabendazol en especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de aguacate.

Especie	Cepa	CE ₅₀	CE ₉₅	ES CE ₅₀	ES CE ₉₅	Modelo	Log Verosimilitud	CIA	Falta de ajuste	Varianza residual
<i>C. siamense</i>	CPO 27.415	0.22	0.55	0.004	0.019	BC.4	-36.446	82.893	0.9970	1.46
<i>C. chrysophilum</i>	CPO 27.709	0.23	0.49	0.009	0.033	LL.4	-55.94	121.88	0.9980	7.43
	CPO 27.845	0.15	0.45	0.011	0.033	CRS.4b	-51.333	112.66	0.0260	5.06
<i>C. tropicale</i>	CPO 27.477	0.19	0.46	0.003	0.012	LL.4	-39.225	88.45	0.4950	1.85
<i>C. cigarro</i>	CPO 27.894	0.22	1.31	0.009	0.124	CRS.4b	-69.852	419.7	0.0279	23.70
<i>C. jiangxiense</i>	CPO 27.850	0.19	0.48	0.012	0.036	W2.4	-53.575	117.15	0.3698	6.10
	CPO 27.905	0.19	0.43	0.006	0.017	LL.4	-45.143	100.28	0.0023	3.02
<i>C. karsti</i>	CPO 27.902	0.13	0.29	0.004	0.030	W2.4	-51.976	113.95	0.5264	5.34
	CPO 27.948	0.11	0.21	0.007	0.052	LL.4	-54.164	118.32	0.9022	6.41
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	CPO 27.818	0.20	1.48	0.006	0.118	W2.4	-37.502	85.00	0.0928	1.59
<i>C. godetiae</i>	CPO 27.863	0.12	0.53	0.006	0.108	W2.4	-58.63	127.26	0.3477	9.30
<i>C. fioriniae</i>	CPO 27.857	0.17	0.50	0.004	0.020	LL.4	-42.215	94.43	0.0054	2.37
	CPO 27.835	0.28	0.32	0.015	0.021	W2.4	-43.188	96.37	0.3628	2.57
<i>C. nympheae</i>	CPO 27.843	0.22	0.40	0.016	0.032	LL.4	-48.021	106.04	0.4460	3.84
	CPO 27.833	0.09	0.60	0.007	0.120	LL.4	-54.959	119.91	0.0707	6.85
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	CPO 27.832	0.30	0.90	0.009	0.058	LL.3	-62.193	132.38	0.0493	11.92

CIA: Criterio de Información de Akaike

ES CE: Error estándar de la concentración efectiva

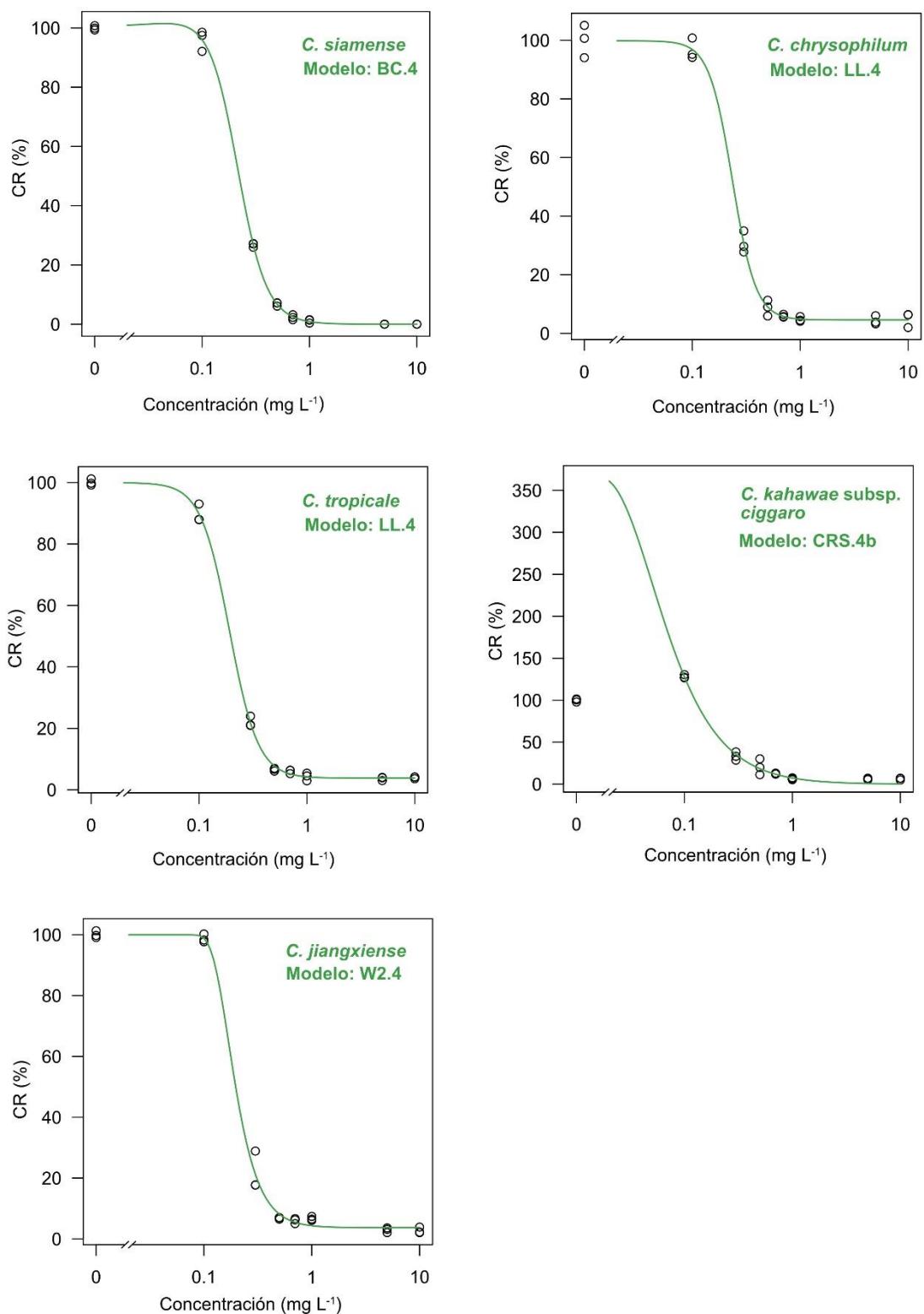


Figura 1. Curvas de dosis-respuesta del tiabendazol sobre especies del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* de aguacate. CR: Crecimiento relativo.

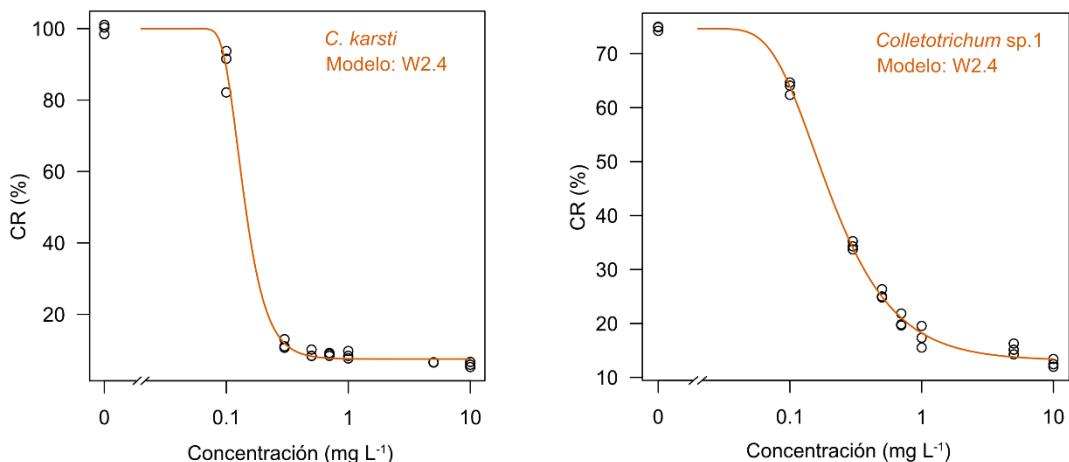


Figura 2. Curvas de dosis-respuesta del tiabendazol sobre especies del complejo *Colletotrichum boninense* de aguacate. CR: Crecimiento relativo.

En los valores utilizados para seleccionar los mejores modelos para tiabendazol, se observaron valores significativos de falta de ajuste ($\alpha=0.05$) en cuatro *C. chrysophilum* CPO 27.845, *C. cigarro* CPO 27.894, *C. jiangxiense* CPO 27.905 y *C. fioriniae* CPO 27.857, con valores de 0.0260, 0.0279, 0.0023, y 0.0054, respectivamente (Cuadro 1). En el primer caso, se seleccionó el modelo hormético CRS.4b; sin embargo, visualmente las colonias no mostraron hormesis. Los demás valores (CIA, VL, y suma de residuales) sugirieron que este modelo tuvo el mejor ajuste con respecto a los no horméticos, que considera la evaluación de dosis menores a 0.1 para obtener un mejor intervalo de análisis para que se ajuste a modelos no horméticos. En el segundo caso, también se seleccionó el modelo hormético CRS.4b, donde sí se observó visualmente el efecto de hormesis a concentraciones de 0.1 mg L⁻¹, pero fue necesario un procedimiento similar al caso anterior, debido a que la varianza residual fue alta (23.70). En el caso de *C. jiangxiense* CPO 27.905 el modelo seleccionado fue LL.4 (el más común), sugiriendo analizar otros modelos no horméticos para encontrar un mejor ajuste. Por último, para *C. fioriniae* CPO 27.857 se seleccionó el modelo LL.4,

con un ajuste visualmente adecuado. La falta de ajuste estadístico en este último pudo deberse a un error experimental, debido a que el crecimiento relativo fue mayor a concentraciones de 5 mg L^{-1} , disminuyendo a 10 mg L^{-1} (Figura 3).

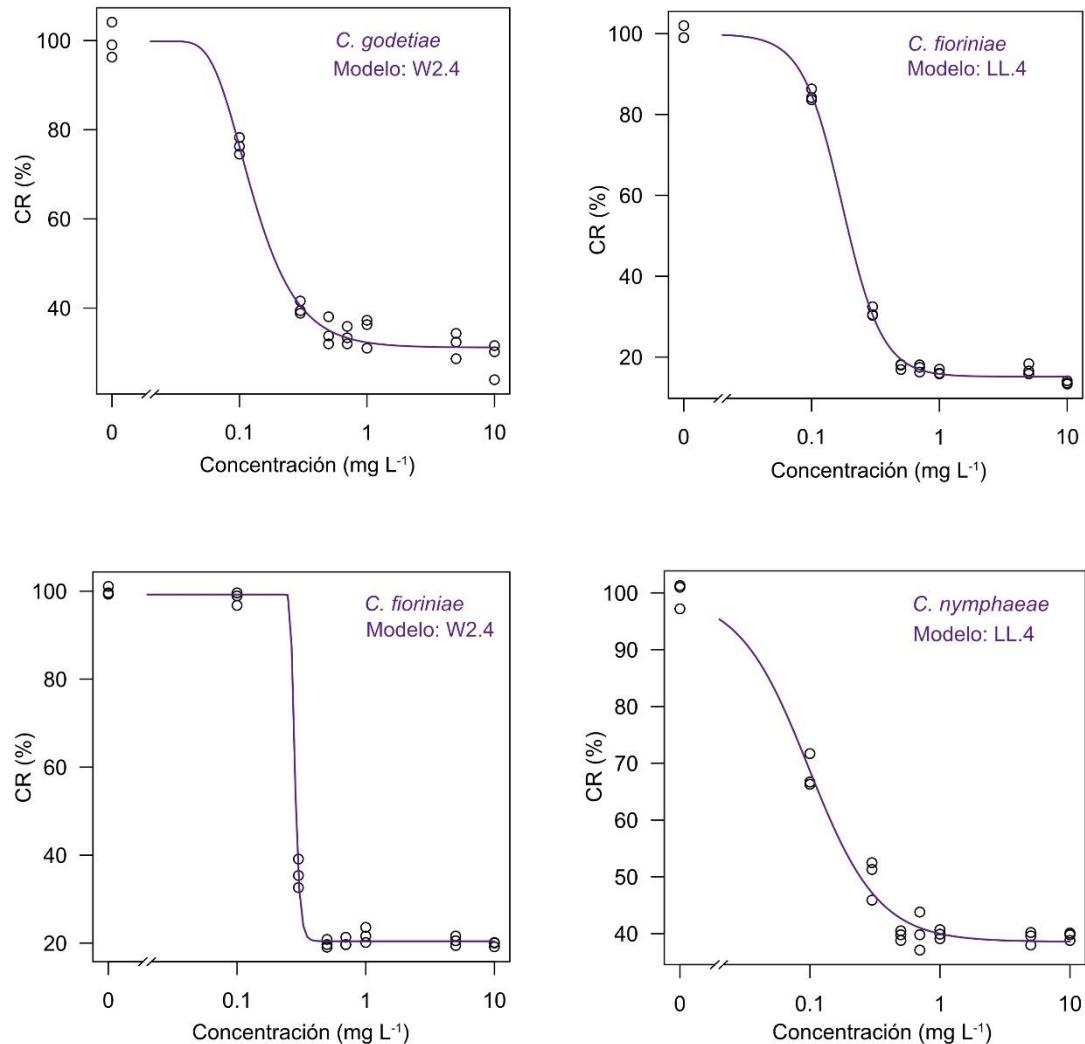


Figura 3. Curvas de dosis-respuesta del tiabendazol en especies del complejo *Colletotrichum acutatum*. CR: crecimiento relativo.

El modelo W2.4 demostró mejor el comportamiento con tiabendazol, debido a que la curva se caracteriza por el descenso rápido desde el límite superior, pero con un desplazamiento lento hacia el límite inferior (Ritz *et al.*, 2020), como se observó en las curvas obtenidas en este estudio (Figura 3).

Los nuevos linajes mostraron alta sensibilidad a tiabendazol y un buen ajuste del modelo para el cálculo de CE₅₀. La cepa *Colletotrichum* sp. 2 fue la única en la que se seleccionó el modelo log-logístico con tres parámetros (LL.3), con un ajuste al límite estadístico ($P = 0.0493$) (Figura 4).

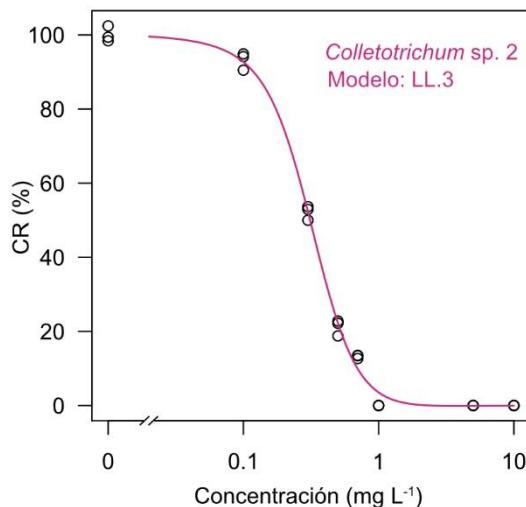


Figura 4. Curva de dosis-respuesta al tiabendazol en el nuevo linaje *Colletotrichum* sp. 2, perteneciente al complejo *Colletotrichum magnum*. CR: crecimiento relativo.

La adición de SHAM al azoxistrobin presentó diferencias respecto al estudio previo sin adición de este compuesto, demostrando que los aislamientos en este estudio usan la ruta alterna de respiración celular, por lo tanto, este ensayo se condujo con la adición de este compuesto.

Debido a que no se observaron diferencias visibles y estadísticas entre las concentraciones 0.03, 0.05 y 0.07 mg L⁻¹ (Figura 5), estas se descartaron para el cálculo de las curvas de respuesta, por lo tanto, solamente se utilizaron las concentraciones 0, 0.01, 0.1, 1, 10 y 1000 mg L⁻¹. Solamente las especies *C. cigarro* CPO 27.939, *Colletotrichum* sp. 1 CPO 27.800, *C. godetiae* CPO 27.907 y *Colletotrichum* sp. 2 CPO 27.832 mostraron

sensibilidad, con valores de CE₅₀<0.1 mg L⁻¹, mientras que las CE₉₅ variaron de 0.3 a 90 mg L⁻¹ (Figura 5, Cuadro 2). Sin embargo, las primeras tres especies mencionadas se ajustaron al modelo hormético CRS.4b, con falta de ajuste significativo ($P < 0.05$). Por lo tanto, aunque visualmente son sensibles, se recomienda evaluar dosis menores a 0.01 y mayores a 100 mg L⁻¹. Las especies remanentes mostraron alta resistencia, creciendo visiblemente a 1000 mg L⁻¹.

Las curvas de respuesta para la mayoría de las cepas resistentes no se ajustaron a ningún modelo evaluado en base al estadístico de falta de ajuste ($P < 0.05$) (Cuadro 2), debido al comportamiento singular de los datos. Por ejemplo, en el caso de *C. nympaeae* CPO 27.843, visualmente se observa hormesis a 0.01 mg L⁻¹, sin embargo, los modelos horméticos evaluados (CRS.4b y BC.4) e incluyendo el modelo Cedergreen, Ritz y Streibig (CRS.6 en el paquete “drc” en R), el cual es una modificación del modelo LL.4 al incluir el cálculo del grado de hormesis (Cedergreen *et al.*, 2005), no se ajustaron a los datos.

En general para esta cepa, la tendencia fue un efecto hormético en la primera dosis baja (0.01 mg L⁻¹), posteriormente en las concentraciones de 0.1 a 10 mg L⁻¹ se estabilizó la sensibilidad y, por último, decreció ligeramente a 1000 mg L⁻¹ a casi 50% de inhibición. Los modelos CRS.6 y BC.4 son sensibles a las magnitudes de las dosis con límite inferior igual o cercano a cero, las cuales son necesarias ajustar manualmente antes de seleccionar el modelo (Belz y Piepho, 2012; Ritz *et al.*, 2020). Por lo tanto, las dosis evaluadas en las cepas resistentes no permitieron el cálculo de las CE₅₀ y CE₉₅. En contraste, *C. jiangxiense* CPO 27.905 mostró hormesis visible en la concentración a 1000 mg L⁻¹ (Figura 5); este efecto a altas concentraciones no se ha reportado en ninguna especie de *Colletotrichum*.

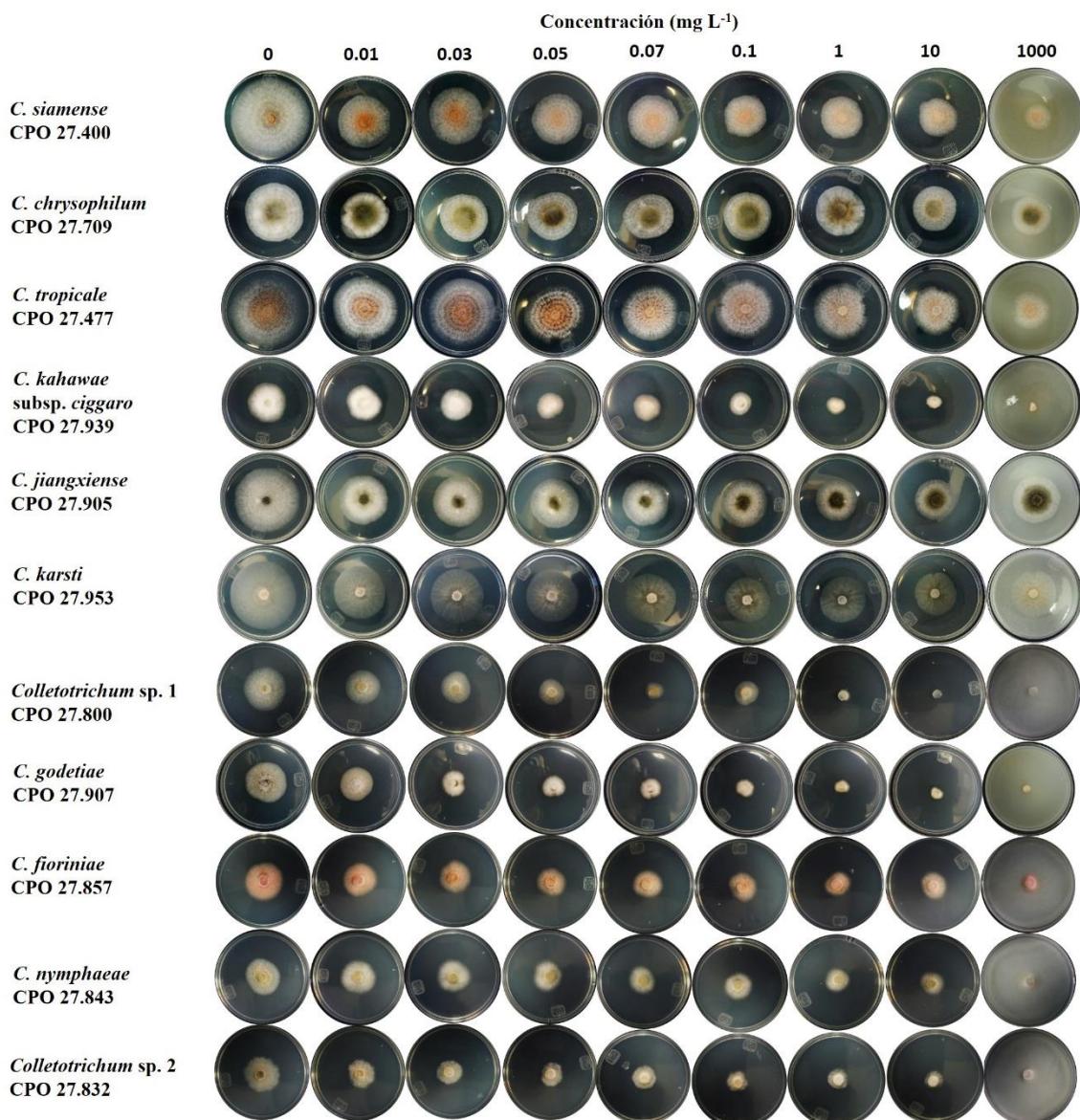


Figura 5. Sensibilidad *in vitro* de azoxystrobin + ácido salicilhidroxámico (100 mg L^{-1}) en 11 especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis del aguacate en México.

El azoxystrobin se ha estudiado con amplitud en una gran diversidad de hongos fitopatógenos. En cuanto a *Colletotrichum*, se han detectado poblaciones sensibles con valores de $\text{CE}_{50} < 6 \text{ mg L}^{-1}$ en el complejo *C. acutatum* (Baggio *et al.*, 2018; Damm *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2020). En otro estudio se detectó una población de *C. acutatum* altamente sensible, con valores de $\text{CE}_{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ (Forcelini *et al.*, 2016), resultados similares a este

estudio en las cepas sensibles. También se han detectado poblaciones resistentes en *C. truncatum* ($CE_{50} > 200 \text{ mg L}^{-1}$) (Torres-Calzada *et al.*, 2015), *C. siamense* ($CE_{50} > 200 \text{ mg L}^{-1}$) (Chechi *et al.*, 2019) y especies en los complejos *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense* ($CE_{50} > 1000 \text{ mg L}^{-1}$) en este estudio.

El efecto hormético y la alta resistencia del azoxistrobin refleja la necesidad de realizar un estudio más amplio que involucre una población más grande, varios ingredientes activos con el mismo mecanismo de acción, detectar la existencia de mutaciones puntuales en el gen *cytb*, y elucidar el mecanismo de hormesis a bajas y altas concentraciones. Diversos estudios demuestran que el efecto hormético de los fungicidas puede deberse a los siguientes factores: estimulación por sobrecompensación de la disrupción de la homeostasis, estimulación directa del crecimiento y metabolización de los fungicidas en moléculas nutrimentales para los hongos (Calabrese, 2001; Calabrese, 2013; Di *et al.*, 2016a). Además de la estimulación del crecimiento, el efecto hormético del trifloxistrobin, carbendazim, flusilazole, iprodiona, boscalid, dimetaclona y procloraz, se refleja en el incremento de la virulencia de hongos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea*, tomando gran importancia por su posible impacto en condiciones de campo (Di *et al.*, 2015; Di *et al.*, 2016b; Cong *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2018a; Lu *et al.*, 2018b; Cong *et al.*, 2019a; Cong *et al.*, 2019b; Zhang *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2020).

En conclusión, los bajos valores de CE_{50} y CE_{95} a tiabendazol sugieren una alta sensibilidad a este fungicida en las especies de *Colletotrichum* que afectan al aguacate, sin embargo, la mayoría de estas fueron altamente resistentes a azoxistrobin. Esta resistencia se debe a la presión de selección alta debido a la aplicación constante de este fungicida, la cual ha causado la prevalencia de aislamientos resistentes.

Cuadro 2. CE50 y CE95 de cuatro especies de *Colletotrichum* obtenidas de frutos de aguacate sensibles a azoxistrobin, incluyendo el mejor modelo de ajuste y parámetros de selección.

Espezie	Cepa	CE ₅₀	CE ₉₅	ES CE ₅₀	ES CE ₉₅	Modelo	Log Verosimilitud	CIA	Falta de ajuste	Varianza residual
<i>C. cigarro</i>	CPO 27.939	0.100	90.37	0.032	47.88	CRS.4b	-52.17	114.34	0.0024	24.78
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	CPO 27.800	0.090	0.31	0.002	0.005	CRS.4b	-33.62	77.25	0.9629	3.15
<i>C. godetiae</i>	CPO 27.907	0.030	22.41	0.005	9.61	CRS.4b	-50.25	110.5	0.0014	20.02
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	CPO 27.832	0.004	14.48	0.001	18.08	LL.4	-46.39	102.79	0.005	13.05

CE50: concentración efectiva 50; CE95: concentración efectiva 95; ES: error estandar, CIA: criterio de información de Akaike.

En conclusión, aunque los resultados de este estudio sugieren que el azoxistrobin es de alto riesgo para el desarrollo de resistencia en poblaciones de *Colletotrichum*, se recomienda monitorear la sensibilidad en un muestreo más amplio, poniendo énfasis en la detección molecular de mutaciones correlacionadas con la resistencia, lo cual permitirá desarrollar técnicas más rápidas y versátiles para el monitoreo de la resistencia, como la técnica de LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) (Hu *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2019). Además, un programa de manejo de resistencia es indispensable, para que los productores adquieran conocimientos en rotación de fungicidas, dosis y tiempos adecuados de aplicación con base en criterios epidemiológicos. En el caso de la hormesis observada con el tiabendazol, es necesario evaluar más dosis para asegurar la presencia de este efecto.

2.6 LITERATURA CITADA

- Avila-Adame, C., G. Olaya, and W. Kölle. 2003. Characterization of *Colletotrichum graminícola* isolates resistant to strobilurin-related Qo1 fungicides. Plant Dis. 87:1426–1432.
- Baggio, J. S., N. Y. Wang, N. A. Peres, and L. Amorim. 2018. Baseline sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from Brazilian strawberry fields to azoxystrobin, difenoconazole and thiophanate-methyl. Trop. Plant Pathol. 43:533–542.
- Belz, R. G., and H. P. Piepho. 2012. Modeling effective dosages in hormetic dose-response studies. PLoS ONE 10:e33432.
- Brain, P., and R. Cousens. 1989. An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Res. 29:93–96.
- Calabrese, E. J. 2001. Oversomption stimulation: a mechanism for hermetic effects. Crit. Rev. Toxicol. 31:425–470.
- Calabrese, E. J. 2013. Hormetic mechanisms. Crit. Rev. Toxicol. 43:580–606.
- Cedergreen, N., C. Ritz, and J. C. Streibig. 2005. Improved empirical models describing hormesis. Environ. Toxicol. Chem. 24:3166–3172.
- Chechi, A., J. Stahlecker, M. E. Dowling, and G. Schnabel. 2019. Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. Pestic. Biochem. Physiol. 158:18–24.
- Chen, S., Y. Wang, G. Schnabel, C. A. Peng, S. Lagishetty, K. Smith, C. Luo, and H. Yuan. 2018. Inherent resistance to 14a-demethylation inhibitor fungicides in *Colletotrichum truncatum* is linked to *CYP51A* and/or *CYP51B* gene variants. Phytopathology 108:1263–1275.
- Cong, M., S. He, H. Ma, G. Li, and F. Zhou. 2018. Hormetic effects of carbendazim on the virulence of *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 102:886–891.
- Cong, M., B. Zhang, K. Zhang, Q. Li, and F. Zhu. 2019a. Stimulatory effects of sublethal doses of carbendazim on the virulence and sclerotial production of *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 103: 2385–2391.
- Cong, M., S. He, J. Zhang, C. Luo, and F. Zhu. 2019b. Hormetic effects of mixtures of carbendazim and iprodione on the virulence of *Bitrytis cinerea*. Plant Dis. 103:95–101.
- Damm, U., Y. C. Sun, and C. J. Huang. 2020. *Colletotrichum eriobotryae* sp. nov. and *C. nymphaeae*, the anthracnose pathogens of loquat fruit in central Taiwan, and their sensitivity to azoxystrobin. Mycol. Prog. 19:367–380.
- Di, Y. L., Z. Q. Zhou, X. M. Lu, and F. X. Zhu. 2015. Pathogenicity stimulation of *Sclerotinia sclerotiorum* by subtoxic doses of carbendazim. Plant Dis. 99:1342–1346.
- Di, Y. L., M. L. Cong, R. Zhang, and F. X. Zhu. 2016a. Hormetic effects of trifloxystrobin on aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 100:2113–2118.

- Di, Y. L., X. M. Lu, Z. Q. Zhu, and F. X. Zhu. 2016b. Time course of carbendazim stimulation on pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* indicates a direct stimulation mechanism. *Plant Dis.* 100:1454–1459.
- Epinoza-Altamirano, D., H. V. Silva-Rojas, S. G. Leyva-Mir, N. Marbán-Mendoza, y A. Rebollar-Alviter. 2017. Sensibilidad de aislados de *Colletotrichum acutatum* obtenidos de fresa a los fungicidas metil tiofanato y azoxistrobin. *Rev. Mex. Fitopatol.* 35:186–203.
- Fan, F., M. Hahn, G. Q. Li, Y. Lin, and C. X. Luo. 2019. Rapid detection of benzimidazole resistance in *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathol. Res.* 1:10.
- Forcelini, B. B., T. E. Seijo, A. Amiri, and N. A. Peres. 2016. Resistance in strawberry isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to quinone-outside inhibitor fungicides. *Plant Dis.* 100:2050–2056.
- Fuentes-Aragón, D., S. B. Juárez-Vázquez, M. Vargas-Hernández, and H. V. Silva-Rojas. 2018. *Colletotrichum fructicola*, a member of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato, is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. ‘Hass’. *Mycobiology* 46:92–100.
- Fuentes-Aragón, D., V. Guarnaccia, A. Rebollar-Alviter, S. B. Juárez-Vázquez, F. Aguirre-Ray, and H. V. Silva-Rojas. 2020. Multilocus identification and thiophanate-methyl sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex associated with fruit with symptoms and symptomless leaves of mango. *Plant Pathol.* 69:1125–1138.
- Gao, Y. Y., L. F. He, B. X. Li, W. Mu, J. Lin, and F. Liu. 2020. Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to six fungicides and reduction in incidence and severity of chili anthracnose usin pyraclostrobin. *Austral. Plant Pathol.* 46:521–528.
- Gutiérrez-Alonso, J. G., O. Gutiérrez-Alonso, D. Nieto-Ángel, D. Téliz-Ortíz, E. Zavaleta-Mejía, F. Delgadillo-Sánchez, y H. Vaquera-Huerta. 2003. Resistencia a benomil y tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en cinco de regiones de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:260–266.
- Hernández-Lauzardo, A. N., A. Campos-Martínez, M. G. Velázquez-del Valle, E. Flores-Moctezuma, R. Suárez-Rodríguez, and J. A. Ramírez-Trujillo. 2015. First report of *Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on avocado in Mexico. *Plant Dis.* 99:555.
- Hu, M. J., A. Grabke, M. E. Dowling, H. J. Holstein, and G. Schnabel. 2015. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. *Plant Dis.* 99:806–814.
- Hu, X. R., D. J. Dai, H. D. Wang, and C. Q. Zhang. 2017. Rapid on-site evaluation of the development of resistance to quinone outside inhibitors in *Botrytis cinerea*. *Sci. Rep.* 7:13861.
- Hu, S., Q. Xu, Y. Zhang, and F. Zhou. 2020. Stimulatory effects of boscalid on virulence of *Sclerotinia sclerotiorum* indicate hormesis may be masked by inhibitors. *Plant Dis.* 104:833–840.

- Jian, J. H., L. S. Ding, T. J. Michailiades, H. Y. Li, and Z. H. Ma. 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Pest. Biochem. Physiol. 93:72–76.
- Koenraadt, H., S. C. Somerville, and A. L. Jones. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturias inaequalis* and other plant pathogenic fungi. Phytopathology 82:1348-1354.
- Liang, H. J., Y. L. Di, J. L. Li, H. You, and F. X. Zhu FX. 2015. Baseline sensitivity of pyraclostrobin and toxicity of SHAM to *Sclerotium sclerotiorum*. Plant Dis. 99:267–273.
- Liang, H., J. Li, C. Luo, J. Li, and F. X. Zhu. 2019. Effect of SHAM on the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* to Qo1 fungicides. Plant Dis. 103:1884–1888.
- Lin, T., X. F. Xu, D. J. Dai, H. J. Shi, H. D. Wang, and C. Q. Zhang. 2016. Differentiation in development of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* complex populations from strawberry and grape hosts. Austral. Plant Pathol. 45:241–249.
- Lu, X., R. Zhang, M. Cong, J. Li, and F. Zhu. 2018a. Stimulatory effects of flusilazole on virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 102:197–201.
- Lu, X., S. He, H. Ma, J. Li, and F. Zhu. 2018b. Hormetic effects of flusilazole preconditioning on mycelial growth and virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Dis. 102:1165–1170.
- Maienfisch, P., and A. J. F. Edmunds. 2017. Thiazole and isothiazole ring-containing compounds in crop protection. In: Advances in heterocyclic chemistry. Scriven EFV, Ramsden CA (Eds.). Academic Press, United Kingdom. pp: 35–88.
- Maymon, M., A. Zveibil, S. Pivonia, D. Minz, and S. Freeman. 2006. Identification and characterization of benomyl-resistant and sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* sp.). Phytopathology 96:542–548.
- Mendiburu, F. D. 2015. Agricolae: statistical producers for agricultural research. R package version 1.2-3. On line: <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Moreira, R. R., N. A. Hamada, N. A. Peres, and L. L. May de Mio. 2019. Sensitivity of the *Colletotrichum acutatum* species complex from apple trees in Brazil to dithiocarbamates, methyl benzimidazole carbamates, and quinone outside inhibitor fungicides. Plant Dis. 103:2569–2576.
- Pradhan, S., L. Miller, V. Marcillo, A. R. Koch, N. G. Grachet, et al. 2019. Hormetic effects of thiophanate-methyl in multiple isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. Plant Dis. 103:89–94.
- Price, P. P. , M. A. Purvis, G. Cai, G. B. Padgett, C. I. Robertson, R. W. Schneider, and S. Albu. 2015. Fungicide resistance in *Cercospora kikuchii*, a soybean pathogen. Plant Dis. 99:1596–1603.
- Ren, L., S. F. Wang, X. J. Shi, J. Y. Cao, J. B. Zhou, and X. J. Zhao. 2020. Characterisation and sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici*, causing pepper anthracnose, to picoxystrobin. J. Plant Dis. Protect. In press.

- Ritz, C., F. Baty, J. C. Streibig, and D. Gerhard. 2015. Dose response analysis using R. PLoS ONE 10:e0146021.
- Ritz, C., S. M. Jensen, D. Gerhard, and J. C. Streibig. 2020. Dose-response analysis using R. CRC Press, USA. 213 p.
- Rodríguez-López, E. S., E. Cárdenas-Soriano, S. Hernández-Delgado, A. Gutiérrez-Diez, and N. Mayek-Pérez. 2013. Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de agucatero. Rev. Bras. Frutic. 35:898–905.
- Seyran, M., T. B. Brenneman, and K. L. Stevenson. 2010. In vitro toxicity of alternative oxidase inhibitors salicylhydroxamic acid and propyl gallate on *Fusicladium effusum*. J. Pestic. Sci. 83:421–427.
- Sierotzki, H., J. Wullschleger, and U. Gisi. 2000. Point mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. Pestic. Biochem. Physiol. 68:107–112.
- Silva-Rojas, H. V., and G. D. Ávila-Quezada. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. Plant Pathol. 60:899–908.
- Tanton, L. L., C. E. Nargang, K. E. Kessler, Q. Li, and F. E. Nargang. 2003. Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. 39:176–190.
- Tashiro, N., K. Manabe, and Y. Ide. 2012. Emergence and frequency of highly benzimidazole-resistant *Colletotrichum gloeosporioides*, pathogen of Japanese pear anthracnose, after discontinued use of benzimidazole. J. Gen. Plant Pathol. 78:221–226.
- Torres-Calzada, C., R. Tapia-Russel, I. Higuera-Ciapara, R. Martin-Mex, A. Nexticapan-Garcez, and D. Perez-Brito. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. Plant Dis. 99:1590–1595.
- Velázquez-del Valle, M. G., A. Campos-Martínez, H. E. Flores-Moctezuma, R. Suárez-Rodríguez, J. A. Ramírez-Trujillo, and A. N. Hernández-Lauzardo. 2016. First report of avocado anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. Plant Dis. 100:534.
- Wood, P. M., and D. W. Hollomon. 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. Pest Manag. Sci. 59:499–511.
- Xu, X. F., T. Lin, S. K. Yuan, D. J. Dai, H. J. Shi, C. Q. Zhang, and H. D. Wang. 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. Austral. Plant Pathol. 43:605–613.
- Young, J. R., M. Tomaso-Peterson, K. de la Cerda, and F. P. Wong. 2010b. Two mutations in β-tubulin 2 gene associated with thiophanate-methyl resistance in *Colletotrichum cereale* isolates from creeping bentgrass in Mississippi and Alabama. Plant Dis. 94:207–212.

- Young, J. R., M. Tomaso-Peterson, L. P. Tredway, and K. de la Cerdá. 2010a. Occurrence and molecular identification of azoxystrobin-resistant *Colletotrichum cereal* isolates from golf course putting greens in the Southern United States. *Plant Dis.* 94:751–757.
- Yahia, E. M., and A. B. Woolf. 2011. Avocado. In: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Volume 2. Woodhead Publishing. UK. Pp: 125–185.
- Zhang, C. Q., S. K. Yuan, H. Y. Sun, Z. Q. Qi, M. G. Zhou, and G. N. Zhu. 2007. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetables greenhouses to boscalid. *Plant Pathol.* 56:646–653.
- Zhang, C., Y. Liu, L. Ding, and G. Zhu. 2011. Shift of sensitivity of *Botrytis cinerea* to azoxystrobin in greenhouse vegetables before and after exposure to the fungicides. *Phytoparasitica* 39:293–302.
- Zhang, C. Q., Y. H. Liu, H. M. Wu, B. C. Xu, P. L. Sun, and Z. H. Xu. 2012. Baseline sensitivity of *Pestalotiopsis microspora*, which causes black spot disease on Chinese hickory (*Carya cathayensis*), to pyraclostrobin. *Crop Prot.* 42:256–259.
- Zhang, C., Y. Diao, W. Wang, J. Hao, M. Imran, and H. Duan. 2017. Assessing the risk for resistance and elucidating the genetics of *Colletotrichum truncatum* that is only sensitive to some DMI fungicides. *Front. Microbiol.* 8:1779.
- Zhang, R., Y. Zhang, Q. Xu, J. Li, and F. Zhu. 2019. Hormetic effects of mixtures of dimethachlone and prochloraz on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 103:546–554.

CONCLUSIONES GENERALES

- Todos los aislamientos obtenidos de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis pertenecen a los complejos de especies *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. boninense* y *C. magnum*.
- El análisis filogenético multilocus demostró que once especies de *Colletotrichum* están asociados a los síntomas de antracnosis en frutos de aguacate, de las cuales *C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. nymphaeae* y *C. tropicale* se reportaron por primera vez en aguacate en el mundo; mientras que *C. siamense*, *C. fioriniae* y *C. cigarro* se reportaron por primera vez en México.
- Se encontraron dos nuevos linajes, los cuales representan dos especies no descritas de acuerdo a características morfológicas, identificación filogenética y la delimitación de especies con base a la Concordancia Genealógica Filogenética.
- *Colletotrichum siamense* presentó la mayor frecuencia de aislamiento, mientras que las especies reportadas por primera vez en aguacate, incluyendo los nuevos linajes, fueron las menos frecuentes.
- *Colletotrichum karsti* fue la más distribuida, encontrada en Michoacán, Morelos, Puebla y Oaxaca.
- En la región de Puebla se encontró la mayor cantidad de especies (*C. chrysophilum*, *C. jiangxiense*, *C. karsti*, *C. nymphaeae*, *C. godetiae*, *C. fioriniae* y *Colletotrichum sp. 2*).
- Las pruebas de patogenicidad demostraron que todas las especies fueron patogénicas en frutos de aguacate. Además, las especies pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides* fueron más virulentas, a excepción de *C. cigarro*.

- Las pruebas de sensibilidad a fungicidas demostraron que el tiabendazol fue efectivo para inhibir el crecimiento micelial de las once especies encontradas en este estudio, con valores de $CE_{50} < 0.04 \text{ mg L}^{-1}$ y $CE_{95} < 2 \text{ mg L}^{-1}$.
- Las especies *C. siamense*, *C. chrysophilum*, *C. tropicale*, *C. jiangxiense*, *C. karsti*, *C. fioriniae* y *C. nymphaeae* fueron altamente resistentes a azoxistrobin, con valores de $CE_{50} > 1000 \text{ mg L}^{-1}$; mientras que las especies *C. cigarro*, *Colletotrichum* sp. 1 y 2, y *C. godetiae* fueron sensibles con valores de $CE_{50} < 0.1 \text{ mg L}^{-1}$.