



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**ANTRACNOSIS DEL FRUTO DE LITCHI (*Litchi chinensis* Soon.):
ETIOLOGÍA Y CONTROL *IN VITRO*.**

MISAEEL MARTÍNEZ BOLAÑOS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2012

La presente tesis, titulada: **Antracnosis del fruto de litchi (*Litchi chinensis* Soon.): etiología y control *in vitro***. Realizada por el alumno: **Misael Martínez Bolaños**, 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
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJERO



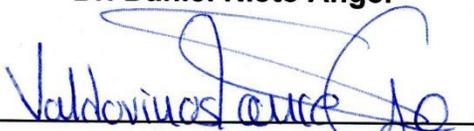
Dr. Daniel Téliz Ortiz

ASESOR



Dr. Daniel Nieto Ángel

ASESOR



Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

ASESOR



Dr. José Antonio Mora Aguilera

ASESOR



Dr. Etiseo García Pérez

Montecillo, Texcoco, México, 03 de Agosto de 2012

RESUMEN GENERAL

El litchi (*Litchi chinensis* Soon) es un fruto subtropical. El cultivar Brewster se explota comercialmente en la región del Papaloapan y el cv. Mauritius en los Bajos Mixes, Oaxaca, México. El manchado del pericarpio es uno de los problemas principales en pre y postcosecha del fruto en ambos cultivares. No se han encontrado registros de su causa o importancia en México, por ello los objetivos de esta investigación fueron: determinar la etiología del manchado café del pericarpio e iniciar la exploración del control *in vitro* de su agente causal.

La antracnosis o manchado del pericarpio del litchi se caracterizó externa e internamente por lesiones circulares de color café, con márgenes bien definidos en el pericarpio, pero sin afectar el arilo o la semilla. La incidencia de la antracnosis en campo fue del 52% de 4,220 frutos del cv Mauritius en Loma Bonita, y del 3% de 3,034 frutos del cv Brewster en San José Chiltepec, Oaxaca en el ciclo de producción 2008-2009. *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., y *Lasiodiplodia* sp., se aislaron del pericarpio de frutos sintomáticos de litchi de los cultivares Mauritius y Brewster en los ciclos de producción 2008-2010. Sólo *Colletotrichum* sp., indujo la enfermedad en laboratorio (17 de 20 frutos inoculados) y campo (19 de 20 frutos inoculados). El hongo se identificó morfológica y molecularmente como *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

El efecto de cinco fungicidas (benomil, procloraz, boscalid/pyraclostrobin, cyprodinil/fludioxinil e hidróxido de cobre) en la germinación de conidios y crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* se evaluó *in vitro*. Boscalid/pyraclostrobin obtuvo la

menor concentración efectiva para reducir el 50% (CE_{50}) del crecimiento micelial y germinación de conidios (0.0111 y 0.66962, respectivamente).

ABSTRACT

Litchi (*Litchi chinensis* Soon) is a subtropical fruit. Brewster and Mauritius cultivars are commercially grown in the Papaloapan and Bajos Mixes, Oaxaca, Mexico. Brown spot on the pericarp is one of the main pre and postharvest problems in both cultivars. No records about its cause and importance in Mexico have been found so far. The objectives of this study were to determine the etiology of the brown spot and to initiate the exploration of the *in vitro* control of the causal agent.

Anthrachnose or brown spot of litchi fruits was characterized by internal and external brown circular lesions with well-defined margins on the pericarp, but not on the aril or seed. Anthracnose incidence in a field orchard was 52% from 4,220 cultivar Mauritius fruits in Loma Bonita, and 3% from 3,034 cultivar Brewster fruits in San Jose Chiltepec, Oaxaca in 2008–2009 harvesting cycles. *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., and *Lasiodiplodia* sp. were isolated from symptomatic fruit pericarp samples of cv Mauritius and Brewster in 2008-2010 cycles. Only *Colletotrichum* sp., reproduced the disease in the laboratory (17 out of 20 inoculated fruits) and in the field (19 out of 20 inoculated fruits). The fungus was morphologically and molecularly identified as *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Five fungicides (benomyl, prochloraz, boscalid/pyraclostrobin, cyprodinil/fludioxinil and copper hydroxide) were tested under *in vitro* conditions to evaluate mycelial growth and conidia germination of *C. gloeosporioides*. The EC₅₀ values for mycelial growth and conidia germination were the lowest for boscalid/pyraclostrobin (0.0111 y 0.66962, respectively).

Dedico esta tesis con cariño:

A mis padres: Marciano Martínez Villegas y Leonor Bolaños Santiago, por haberme dado el regalo más maravilloso que se puede dar en este mundo, la vida. A ti papá.... A ti mamá, Gracias. Por sus enseñanzas y apoyo constante para continuar con mi formación profesional, haciéndome comprender que la base para lograr el éxito, es la superación constante.

A mis mejores amigos, mis hermanos: Jorge, Luciano, Jesús y Rogelio. Gracias, por todo su apoyo brindado constantemente.

A toda mi familia que de una u otra manera, me ayudaron y motivaron para superarme.

A mis amigos y compañeros de la Universidad Autónoma de Chapingo y Colegio de Postgraduados, gracias.

A ti, por los momentos compartidos; tu amistad y confianza brindada. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su inmensurable Amor.

Al Pueblo de México que financió mis estudios a través del CONACyT.

Al Colegio de Postgraduados por permitir realizar mis estudios en esta Honorable Institución en el Programa de Fitosanidad-Fitopatología.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por todas las facilidades otorgadas durante el desarrollo de esta investigación en el Departamento de Parasitología Agrícola.

Al Dr. Daniel Teliz Ortiz, por todas sus enseñanzas que contribuyeron en mi formación profesional y personal.

A los profesores integrantes de mi consejo particular y amigos: Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dra. Guadalupe Valdovinos, Dr. Daniel Nieto, Dr. Antonio Mora Aguilera y Dr. Eliseo García Pérez.

A la Fundación Produce Oaxaca A.C. por el financiamiento parcial del trabajo de investigación.

Al Ing. Luis Martínez Reyes, por su amistad y apoyo técnico durante el desarrollo de la fase de campo de la presente investigación.

Al M.C. Jorge Valdez Carrasco, por su apoyo incondicional para la edición de imágenes del presente trabajo y artículo científico derivado de esta investigación.

Al Ing. Roberto Moreno, Sr. Salvador Moreno y Sr. Horacio Rodríguez, productores cooperantes de litchi en la región Norte de Oaxaca.

CONTENIDO

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Generalidades del litchi.....	3
2.2 Historia y origen.....	3
2.3 Producción mundial y nacional.....	4
2.4 Ubicación taxonómica.....	4
2.5 Descripción botánica.....	4
2.5.1 El árbol.....	4
2.5.2 Sistema radical.....	5
2.5.3 Hojas.....	5
2.5.4 Inflorescencia.....	5
2.5.5 Flores.....	6
2.5.6 Fruto.....	7
2.6 Enfermedades del fruto de litchi.....	7

2.6.1 Tizón suave.....	8
2.6.2 Mancha pimienta.....	9
2.6.3 Pudrición de pedúnculo.....	9
2.6.4 Antracnosis.....	10
3. REFERENCIAS.....	12

CAPÍTULO II

ANTRACNOSIS (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz.) DE FRUTOS DE LITCHI (<i>Litchi chinensis</i> Soon.) EN OAXACA, MÉXICO.....	19
RESUMEN.....	19
ABSTRACT.....	20
1. INTRODUCCIÓN.....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1 Síntomas y caracterización del hongo.....	22
2.2 Pruebas de patogenicidad.....	23
2.3 Caracterización morfológica del patógeno.....	25
2.4 Identificación molecular.....	25

2.5 Incidencia de antracnosis en huertos comerciales.....	27
3. RESULTADOS.....	27
3.1 Caracterización de síntomas.....	27
3.2 Aislamiento de hongos.....	29
3.3 Pruebas de patogenicidad.....	32
3.4 Caracterización e identificación del patógeno.....	33
3.5 Identificación molecular.....	36
3.6 Incidencia de antracnosis en huertos comerciales.....	37
4. DISCUSIÓN.....	37
5. CONCLUSIONES.....	39
6. REFERENCIAS.....	40

CAPÍTULO III

CONTROL QUÍMICO DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AISLADO DE FRUTOS DE LITCHI (<i>Litchi chinensis</i> Soon.) BAJO CONDICIONES <i>IN VITRO</i>	46
RESUMEN.....	46
ABSTRACT.....	47

1. INTRODUCCIÓN.....	48
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
2.1 Aislamiento e identificación del patógeno.....	49
2.2 Patogenicidad en campo.....	50
2.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia de fungicidas.....	50
3. RESULTADOS.....	51
3.1 Aislamiento e identificación del patógeno.....	51
3.2 Patogenicidad en campo.....	52
3.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia de fungicidas.....	52
4. DISCUSIÓN.....	54
5. CONCLUSIONES.....	56
6. REFERENCIAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1. Frutos de litchi (*Litchi chinensis* Soon) cv Brewster (A-C) y Mauritius (D-F). Lesiones café obscuras y circulares en el Exocarpo (A y D) y Endocarpo (B y E). Arilo asintomático (C y F). Patogenicidad de *C. gloeosporioides* en frutos de litchi cv Mauritius, en laboratorio: G) síntomas en exocarpo, H) síntomas en endocarpo, I) frutos testigo. Patogenicidad en frutos de litchi cv Mauritius, en campo: J) síntomas en exocarpo, K) síntomas en endocarpo, L) frutos testigo. Barra= 1 cm..... 28
- Figura 2. Crecimiento miceliar (A, D, G, J) conidios (B, E, H, K) y apresorios (C, F, I, L) de los aislamientos M26 y M28-30, de *C. gloeosporioides* obtenidos de frutos de litchi infectados naturalmente. 34
- Figura 3. PCR de los aislamientos M26 y M28-30 de *C. gloeosporioides*. Línea 1 testigo (H₂O PCR); líneas 2-5 productos de amplificación generados con el par de iniciadores ITS4/ITS5; líneas 6-9 productos de amplificación generados con el par de iniciadores ITS4-CgInt. Líneas 2 y 6: M26, líneas 3 y 7: M28, líneas M29 y 9: M30, línea 10 marcador molecular de 100 pb (InvitrogenTM). 36

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO II

- Cuadro 1. Géneros de hongos aislados de frutos de litchi cv Brewster con y sin síntomas de antracnosis en San José Chiltepec Oaxaca..... 29
- Cuadro 2. Géneros de hongos aislados de frutos de litchi cv Mauritius con y sin síntomas de antracnosis en San Juan Cotzocón Oaxaca..... 31
- Cuadro 3. Características conidiales y tasa de crecimiento miceliar en PDA de los aislamientos M26 y M8-30 de *C. gloeosporioides* obtenidos de frutos de litchi con síntomas de antracnosis en San José Chiltepec y Loma Bonita, Oaxaca (ciclo 2009- 2010)..... 35

CAPÍTULO III

- Cuadro 1. Efecto de cinco fungicidas en el crecimiento miceliar de *C. gloeosporioides* aislado de frutos de litchi cv Mauritius. Valores promedio de 4 repeticiones. Oaxaca, México. 2010..... 53
- Concentración efectiva (CE_{95}) de cinco fungicidas que inhibió el 50% (CE_{50}) del crecimiento miceliar y germinación de conidios de *C. gloeosporioides*
- Cuadro 2. aislado de frutos de litchi cv Mauritius. Oaxaca, México. 2010..... 54

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El litchi (*Litchi chinensis* Soon) es nativo de las tierras bajas de las provincias de Kwangtung y Fukien, en el sur de China. El centro de origen se ubica entre los 23-27° latitud norte, en la parte subtropical del sur de China, norte de Vietnam y Malasia (Yee, 1971). Su cultivo se extendió a través de los años en áreas vecinas de Asia. Galán (1990) y Menzel (2002) reportaron su cultivo en China, India, Tailandia, el sur de Japón, el noroeste de Australia, África Oriental, Hawái, Brasil, México, Florida y otras regiones subtropicales del mundo.

En México, lo introdujeron en 1914 al estado de Sinaloa y en 1996 se reportó su cultivo en Sinaloa, Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Jalisco y Baja California Sur (De la Garza y Cruz, 2001).

Los principales problemas en la producción de este cultivo son rendimientos bajos e irregulares asociados a la caída excesiva de frutos (Chen y Huang, 2001; Ghosh, 2001; Mitra, *et al.* 2005); oxidación del fruto y coartadura de cáscara (Chen y Huang, 2001; Ghosh, 2001; Huang *et al.* 2001; Pereira y Mitra, 2004; Xu *et al.* 2005); daños por microorganismos plaga como *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Campbell y Campbell, 2001; Chen y Huang, 2001), *Peronophythora litchii* Chen Ex Ko; *Tessarotoma papillosa* Drury y *Dasineura* sp., (Chen y Huang, 2001), y a los costos en cosecha y empaque (Ghosh, 2001; Xu *et al.* 2005).

En Oaxaca, México se explotan comercialmente los cultivares Brewster y Mauritius en las regiones del Papaloapan y Bajos Mixes, respectivamente. Los productores del estado consideran que uno de los problemas principales en pre y postcosecha en

ambos cultivares es el manchado del pericarpio. Los síntomas observados en campo son lesiones circulares secas de color café en el pericarpio, mientras que el arilo y semilla no muestran daño. No se han encontrado registros de su causa o importancia en México; sin embargo, productores de la entidad reportan daños hasta del 50% en la producción. Por la importancia socioeconómica del problema el objetivo de esta investigación fue determinar la etiología del manchado café del pericarpio en frutos de litchi y el control *in vitro* de su agente causal.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del litchi

El litchi es un árbol de clima subtropical; su fruto es una drupa no-climatérica con pericarpio delgado (1-3 mm), de consistencia leñosa, textura rugosa, sabor agridulce, excelente aroma, alto valor nutritivo y atractivo color rojo intenso en madurez de consumo (Wang *et al.* 2010; Sarin *et al.* 2009). La pulpa o arilo es de color blanco perla que cubre la semilla (Nacif *et al.* 2001). El fruto se consume en estado fresco, congelado, enlatado o deshidratado (Kabir *et al.* 2005).

Debido a la demanda y los precios del litchi, especialmente en los mercados europeo y estadounidense, ha habido un aumento en la superficie cultivada y en el material de propagación para incrementar su producción en México (Osuna *et al.* 2008).

2.2 Historia y origen

El litchi es nativo de las provincias de Kwangtung y Fukien en el sur de China, donde aún se encuentra en estado silvestre (Higgins, 1971).

Debido a la escasa viabilidad de la semilla, lo cual dificulta el obtener nuevas plantas, su dispersión a otros sitios fue muy lenta (Schwentenius y Gómez, 2001).

Entró al continente Americano en 1873 por Hawái y Florida (ASERCA-CIESTAAM, 1996) y a México en 1914 por el estado de Sinaloa. En 1996 se reportó su cultivo en Sinaloa, Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Jalisco y Baja California Sur (De la Garza y Cruz, 2001).

2.3 Producción mundial y nacional

La producción del litchi en el mundo se estima en alrededor de 2.3 millones de t, el 96% se produce en Asia, China, India, Taiwán, Tailandia y Vietnam (Houbin, 2006), y un menor porcentaje en los EUA, México y Suramérica (Cronje *et al.* 2006).

En México, los estados donde se cultiva son: Veracruz, Oaxaca, Puebla, San Luís Potosí, Sinaloa, Michoacán, Nayarit, Hidalgo, Morelos, Baja California Sur y Jalisco (SIAP, 2010). En el estado de Oaxaca, la superficie plantada se incrementó en un 47% del 2009 (555 ha) a 2010 (1,040 ha). El 70% del total de la producción (7,562 ton) de litchi en este estado es de temporal (ASERCA, 2004).

2.4 Ubicación taxonómica

El litchi es una especie perennifolia perteneciente a la familia Sapindaceae, la cual comprende 150 géneros y más de 2000 especies (Menzel, 1991), distribuidas en las regiones subtropicales, cálidas y tropicales del mundo. Algunas especies de la familia Sapindaceae son el longan (*Dimocarpus longan*), el pulusán (*Nephelium mutabile* Blume) y el rambután (*Nephelium lappaceum* L.) (Galán, 1987; Schwentesius y Gómez, 2001).

2.5 Descripción botánica

2.5.1 El árbol

El árbol de litchi es subtropical perenne y de lento crecimiento (Paull, 2011), alcanza los 10-12 m de altura, aunque se reportan ejemplares de más de 20 m (Zhang, 1997). Forma una copa redonda densa, compacta y simétrica.

El tallo es grueso, recto y corto. La vida productiva del árbol es de muchos años, dependiendo del cuidado y de las condiciones agroclimáticas (Galán, 1987). Acorde a Menzel (1991), un árbol de 4 años produce 0.9-1.4 kg de fruta, mientras que uno de 12 años tiene una media de producción de 140 kg.

2.5.2 Sistema radical

Los árboles de litchi presentan un sistema radical desarrollado por una raíz pivotante, raíces secundarias y terciarias bien distribuidas (Galán, 1987). Debido a que la mayoría de las plantas se obtienen de la propagación por acodo, sus raíces se desarrollan superficialmente y no existe la raíz principal (Menzel, 2002).

2.5.3 Hojas

Las hojas son compuestas, alternas, pecioladas y uniformemente pinnadas con dos a ocho folíolos, coriáceas, oblongas-elípticas a lanceoladas, notoriamente agudas, lisas y de textura suave. La lámina es de color verde oscuro brillante por el haz y glaucas por el envés (Crane *et al.* 1998).

Después de cosechar los frutos, una o más de las yemas que se encuentran atrás de la zona en donde se produjo la inflorescencia, producirá un flujo de crecimiento vegetativo para dar origen a una rama (Robbertse *et al.* 1995).

2.5.4 Inflorescencia

La inflorescencia del litchi es una cima (Robbertse *et al.* 1995), compuesta de varias panículas producidas en ramas del año; normalmente son terminales y en

racimos de 10 o más; generalmente son mixtas, diferenciando las yemas basales, mientras que las intermedias desarrollan flores en las axilas de las hojas (Crane *et al.* 2009; Galán, 1987).

Su forma de brotación es similar a un flujo vegetativo, por ello sólo cuando el primordio de los brotes axilares de las hoja pequeñas aparece, es posible identificar la inflorescencia en desarrollo (Gazit y Stern, 2003).

Una inflorescencia puede tener hasta 3000 flores, aunque sólo 100- 200 son polinizadas (Galán, 1987).

2.5.5 Flores

La flor de litchi mide de 3-8 mm de diámetro, 7-12 mm de longitud y tiene un pedicelo de 6 mm de largo. Todas las flores poseen cáliz con 4-5 sépalos cortos y dentados, carecen de pétalos (Galán, 1990) y se forman en la inflorescencia en crecimiento parcial o dicasio (Robbertse *et al.* 1995).

Dentro de la misma inflorescencia existen tres tipos de flores: Tipo I, hermafrodita con ovario abortivo (funcionalmente masculinas); Tipo II, hermafroditas con estambres pequeños e infértiles (funcionalmente femenina); y Tipo III, masculinas (Robbertse *et al.* 1995; Menzel, 2002).

Stern *et al.* (1993) reportaron 34, 32 y 34% para el tipo I, II y III, respectivamente, en el cultivar Mauritius; mientras que para el cultivar Brewster, Osuna *et al.* (2008) reportaron una distribución de 70, 19 y 11% para los tipos I, II y III, respectivamente.

2.5.6 Fruto

El fruto es una drupa que pesa entre 12 y 25 g; es de forma redonda, ovoide, acorazonada o arriñonada; el tamaño es variable según el cultivar pero llega a alcanzar hasta 3 a 4 cm de largo y 3 cm de diámetro (Menzel, 2002).

A medida que el fruto se desarrolla el pericarpio se diferencia en exocarpo, mesocarpo y endocarpo (Stela *et al.* 2001).

El arilo o pulpa, la porción comestible del fruto, es de color blanco, consistente y se encuentra cubriendo una semilla (Nacif *et al.* 2001). Al inicio del desarrollo del fruto, aparece como un anillo de tejido blanco alrededor de la base de la semilla. Su desarrollo inicial es lento y el crecimiento rápido ocurre posterior al desarrollo de la semilla (Gazit y Stern, 2003).

La semilla es brillante, color marrón oscura - café, de forma ovoide a oblonga y representa aproximadamente de 10-18% del peso del fruto (Menzel, 1991). El tamaño de la semilla varía según el cultivar, la mayoría de ellos tienen semillas de tamaño mediano a grande (Nakasone y Paul, 1998).

La curva de crecimiento del fruto de litchi es de tipo simple sigmoide, la cual se puede dividir en dos fases: la primera caracterizada por el crecimiento activo del pericarpio y la semilla, y la segunda por un crecimiento rápido del arilo (Chamhum *et al.* 2006; Huang y Xu, 1983).

2.6 Enfermedades del fruto de litchi

La mayoría de las manchas foliares, marchitamiento de inflorescencias y enfermedades en precosecha del fruto tienen poco impacto en la producción comercial.

Sin embargo, la pudrición del pedúnculo y la antracnosis del fruto son enfermedades comunes en postcosecha sobre las que se requieren más estudios para determinar su etiología (Coates *et al.* 2005).

2.6.1 Tizón suave

Es la enfermedad más importante del litchi en China (Chi *et al.* 1984) Taiwán (Kao y Leu, 1980; Ann y Ko, 1984), Tailandia y Vietnam (Vien *et al.* 2001). El agente causal es el cromista *Peronophythora litchii* (Ko *et al.* 1978).

Frutos, inflorescencias y hojas son afectados (Ann y Ko, 1984; Chi *et al.* 1984). Las flores infectadas se tornan de color café y en condiciones de alta humedad se cubren de micelio y masas de esporangios y esporangióforos. Los frutos, pedicelos y hojas también son atacados, sus tejidos se tornan color café y mueren. Los frutos infectados pueden caer de manera prematura (Ko *et al.* 1978).

Los esporangios del oomiceto se dispersan por las gotas de lluvia. En el norte de Vietnam, el desarrollo de la enfermedad se favorece con climas frescos durante la floración y desarrollo del fruto (Vien *et al.* 2001). Las infecciones primarias se desarrollan a partir de penetración directa de las zoosporas al hospedero, con periodos de incubación menores a 1 día a 25 °C (Chi *et al.* 1984). Chen *et al.* (1998) sugirieron que *P. litchii* puede penetrar directamente al fruto de litchi en condiciones de campo.

Para reducir el inóculo se deben podar las ramas enfermas después de la cosecha, eliminar hojas y frutos enfermos y asperjar las inflorescencias con cobre durante el invierno (Li, 1997). Aspersiones de metalaxil y mancozeb son efectivas al inicio de la floración, durante el amarre de frutos y etapas previas a la cosecha (Li,

1997). Ann (2001) reportó control efectivo a nivel de campo en Taiwán al usar fosfonatos.

A la fecha, esta enfermedad no se ha registrado ni observado en Oaxaca, México.

2.6.2 Mancha pimienta

El agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* (Cooke y Coates, 2002), induce manchas oscuras de tamaño de la cabeza de un alfiler y ligeramente elevadas que se desarrollan principalmente en la zona del pedúnculo del fruto (Bagshaw *et al.* 1995). En casos severos las manchas pueden juntarse y obscurecer toda la superficie del fruto (Coates *et al.* 2005). A pesar de que las manchas son superficiales, afectan la calidad y precio del fruto (Bagshaw *et al.* 1995).

Los conidios producidos en las hojas y frutos infectados son la principal fuente de inóculo. Condiciones de alta humedad y calor favorecen la infección y dispersión de la enfermedad. El cultivar Kwai May Pink es altamente susceptible a este patógeno (Coates *et al.* 2005). Drew y Drew (1999) reportaron frutos de litchi afectados con *mancha pimienta* en Australia. Esta enfermedad no se ha observado o registrado en Oaxaca, México.

2.6.3 Pudrición de pedúnculo

La pudrición de pedúnculo es una enfermedad postcosecha común en litchi y es causada por *Lasiodiplodia theobromae*, *Phomopsis* spp., y anamorfos de *Botryosphaeria* spp., (Coates *et al.* 2005). Aunque los síntomas varían según el agente

causal, la pudrición se presenta generalmente como un oscurecimiento del pericarpio en la región del pedúnculo del fruto. A pesar de que no se han establecido los modos de penetración de los hongos, se considera que estos infectan a través del punto de corte en el pedicelo del fruto o por colonización endofítica del pedúnculo (Johnson *et al.* 1998).

2.6.4 Antracnosis

La antracnosis del litchi es causada por *Colletotrichum gloeosporioides*; aunque en Australia también se ha registrado a *C. acutatum* (Johnson *et al.* 2002). El hongo afecta al litchi en postcosecha (McMillan, 1994), aunque los frutos inmaduros pueden también ser infectados y desprenderse de los árboles (Nakasone y Paul, 1998). Hojas, ramitas y flores también son infectados.

Los síntomas en fruto se manifiestan como manchas circulares de color café oscuro. En condiciones de alta humedad, el hongo produce masas de esporas de color salmón (Coates *et al.* 2005). Las hojas y tallos son la principal fuente de inóculo (McMillan, 1994). Los conidios se dispersan por salpique de lluvia y se requiere de agua libre para que infecten los tejidos. La infección ocurre por penetración directa en la cáscara del fruto. Los frutos inmaduros son infectados en campo y el patógeno permanece quiescente hasta que el fruto madura (McMillan, 1994). Temperaturas elevadas después de la cosecha favorecen el desarrollo de la enfermedad.

La incidencia de la enfermedad se reduce con poda de ramas muertas y eliminación de hojas, brotes y frutos infectados. El control químico de la enfermedad es efectivo con aplicaciones precosecha de fungicidas como mancozeb y benzimidazoles

(McMillan, 1994; Crane *et al.* 1997). Tratamientos en postcosecha del fruto con dióxido de sulfuro (Tongdee, 1986), benomil (Scott *et al.* 1982; Huang y Scott, 1985) y procloraz (Brown *et al.* 1984) controlan la antracnosis. Las pudriciones en postcosecha se reducen con el almacén de los frutos a 5 °C; sin embargo, los frutos infectados se pudren rápidamente al salir a temperatura ambiente.

3. REFERENCIAS

- Ann, P. J. 2001. Control of plant diseases with the non-pesticide compound: phosphorous acid. *Plant Pathology Bulletin* 10 (4): 147-154.
- Ann, P. J. and Ko, W. H. 1984. Blossom blight of litchi in Taiwan caused by *Peronophythora litchii*. *Plant Disease* 68: 826.
- ASERCA. 2004. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. *Revista Claridades Agropecuarias* 74: 32-48.
- ASERCA-CIESTAAM. 1996. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA) Universidad Autónoma Chapingo (UACH) Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Mercado del litchi Mexicano.
- Bagshaw, J. S., Underhill, S. J. R. and Fitzell, R. D. 1995. Lychees: Disorders and Injuries. In: Coates, L., Cooke, T., Persley, D., Beattie, B., Wade, N. and Ridgway, R. (eds). *Postharvest Diseases of Horticultural Crops, Vol. 2, Tropical Fruit*. Department of Primary Industries, Queensland, Australia, pp. 43-44.
- Brown, B. I., Scott, K. J. and Mayer, D. G. 1984. Control of fruit rots of guava, lychee and custard apple by prochloraz dips. *Singapore Journal of Primary Industries*, 12: 40-49.
- Campbell, R. J. and Campbell, C. W. 2001. Evaluation and introduction of lychee cultivars in South Florida, USA. *Acta Horticulturae* 558: 119-123.
- Chamhum, S. L., Lopes de S. D. and Canto, P. M. Canto. 2006. Desenvolvimento do fruto da lichieira (*Litchi chinensis* Sonn.) 'Bengal'. *Revista Brasileira do Fruticultura* 28: 11-13.

- Chen, H. and Huang, H. 2001. China litchi industry: development, achievements and problems. *Acta Horticulturae* 558: 31-39.
- Chen, L. C., Lai, S. C., Lee, C. C., Chung, Y. W. and Ann, P. J. 1998. Effect of environmental factors on mycelial growth of *Peronophythora litchii*. *Plant Pathology Bulletin* 7(4): 189-200.
- Chi, P. K., Pang, S. P. and Liu, R. 1984. On downy blight of *Litchi chinensis* Sonn. The pathogen and its infection process. *Acta Phytopathologica Sinica* 14: 113-119.
- Coates, L., Zhou, E. and Sittigul, Ch. 2005. Diseases. In: Menzel, C.M. and Waite, G.K. (Eds.) *Litchi and Longan: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing. Pp: 261-72.
- Cooke, A. W. and Coates, L. M. 2002. Pepper spot: a preharvest disease of lychee caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Australasian Plant Pathology* 31: 303-304.
- Crane J. H., Balerdi, F. C. and Maguire, I. 1998. *Lychee Growing in the Florida*. University of Florida, IFAS. <http://edis.ifas.ufl.edu/MG051>.
- Crane J. H., Balerdi, F. C. and Maguire, I. 2009. "Lychee Growing in the Florida Home Landscape". University of Florida. IFAS.
- Crane, J. H., Sanford, R. E. and McMillan, R. T., Jr. 1997. Control of lychee anthracnose by foliar applications of tebuconazole, mancozeb, and copper hydroxide on 'Mauritius' lychee fruit under south Florida conditions. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 110: 149-152.

- Cronje, R. B., Mostert, P. G. and Roets, N. J. R. 2006. Evaluating Maxim® for the increase in fruit size and retention in litchi. SA Litchi Grower's Association Yearbook 18: 14-17.
- De la Garza N. J. y Cruz, F. M. 2001. El Litchi, una alternativa de producción para la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Huichihuayán. Folleto para productores N° 2. SLP, México. 24.
- Drew, H. and Drew, J. 1999. Lychee Pepper Spot Update: November 1999. In: Menzel, C. M., Waite, G. K. and Bronson, R. (eds) Proceedings of the Fifth National Lychee Conference. Australian Lychee Growers' Association, Twin Waters, Queensland, p. 24.
- Galán, S. V. 1987. El Litchi y su Cultivo. Producción y Protección Vegetal. FAO. Roma. 205 p.
- Galán S. V. 1990. Los Frutales Tropicales en los Subtrópicos. 1. Aguacate-Mango-Litchi y Longan. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. 95 p.
- Gazit, S. and Stern, R. 2003. The reproductive biology of the lychee. *Horticultural Reviews* 28: 393-453.
- Ghosh, S. P. 2001. Word trade in litchi: past, present and future. *Acta Horticulturae* 558: 23-29.
- Higgins, J. 1971. The litchi in Hawaii. Hawaii Agricultural Experiment Station. Bulletin 44.
- Huang, X., Li, J., Wang, H., Huang, H. and Gao, F. 2001. The relationship between fruit cracking and calcium in litchi pericarp. *Acta Horticulturae* 558: 209-215.

- Huang, P. Y. and Scott, K. J. 1985. Control of rotting and browning of litchi fruit after harvest at ambient temperatures in China. *Tropical Agriculture* 62: 2-4.
- Huang, H. and Xu, J. 1983. The developmental patterns of fruit tissues and their correlative relationships in *Litchi chinensis* Sonn. *Scientia Horticulturae* 19: 335-342.
- Houbin, C. 2006. The production and uses of litchis in China. College of horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou.
- Johnson, G. I., Joyce, D. C. and Gosbee, M. J. 1998. *Botryosphaeria* (anamorphs *Fusicoccum* and *Dothiorella*), *Diaporthe* (anamorphs *Phomopsis* spp.) and *Lasiodiplodia*: Infection and Defense. In: Johnson, G.I., Highley, E. and Joyce, D.C. (eds) Disease Resistance in Fruit. Australian Centre for International Agricultural Research Proceedings No. 80, pp: 46-52.
- Kabir, J., Roychoudhury, R., Ray, S. K. Dhu, R. S. 2005. Harvesting lychee fruits. *Acta Horticulturae* 665: 339-345.
- Kao, C. W. and Leu, L. S. 1980. Sporangium germination of *Peronophythora litchii*, the causal organism of litchi downy blight. *Mycologia* 72: 737-748.
- Ko, W. H., Chang, H. S., Su, H. J., Chen, C. C. and Leu, L. S. 1978. Peronophythoraceae, a new family of Peronosporales. *Mycologia* 70: 380-384.
- Li, J. 1997. Diseases and Pests and Their Control. In: Zhang, Z. (ed.) *Litchi Pictorial Narration of Cultivation*. Pomology Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, China.
- McMillan, R. T., Jr. 1994. Epidemiology and control of anthracnose of lychee. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 107: 345-346.

- Menzel, C. M. 1991. *Litchi chinensis* Sonn. In: Plant Resources of South-East Asia. E. W. M. Verheij and R. E. Coronel eds. Pudoc Wageningen. Pp 191-195.
- Menzel, C. M. 2002. Lychee Production in Australia. In: Papademetriou, M. K. and Dent, F. J. (eds) Lychee Production in the Asia-Pacific Region. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Bangkok, Thailand. Pp. 14-27.
- Mitra, S. K., Pereira, L. S., Pathak, P. K. and Majumdar, D. 2005. Fruit abscission pattern on lychee cultivars. *Acta Horticulturae* 665: 215-218.
- Nacif, S. R., Sartori, P. A. and Chamhum, S. L. 2001. Morphological and anatomical development of the litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn. Cv. Brewster). *Fruits* 56: 225-233.
- Nakasone, H. Y. and Paul, R. 1998. Tropical Fruits. CAB International. USA. 445 p.
- Osuna E., Valenzuela, G., Dolores, M., Gardea, A. y Villareal, M. 2008. Expresión del sexo y anatomía floral del litchi (*litchi chinensis* Sonn). *Revista Fitotecnia Mexicana* 31: 51-56.
- Pereira, L. S., and Mitra, S. K. 2004. Studies on fruit growth and development of litchi cultivars Bombai, China, Deshi and Early Large Red. *Horticultural Journal, Mohanpu* 17(2): 115-124.
- Robbertse, H., Steyn, M. and Fivas, J. 1995. A reevaluation of tree model, inflorescence morphology and sex ratio in lychee. *Journal American Society of Horticulture* 120: 914-920.
- Sarin, N. B., Prasad, U. S., Kumar, M. and S. M. Jain. 2009. Litchi Breeding for Genetic Improvement. Springer Science Business Media 7: 217-245.

- SIAP. 2010. (SIAP-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México. www.sagarpa.org.mx. (consultado julio de 2012).
- Schwentesius, R. R. y Gómez, C. A. 2001. El litchi, la Fruta más Fina del Mundo. Mundi-Prensa. 2ª edición. México. 144p.
- Scott, K. J., Brown, B. I., Chaplin, G. R., Wilcox, M. E. and Bain, J. M. 1982. The control of rotting and browning of litchi fruit by hot benomyl and plastic film. *Scientia Horticulturae* 16: 253-262.
- Stela, R., Sartori, A. and Chamhum, L. 2001. Morphological and anatomical development of the litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn. Cv. Brewster). *Fruits* 56: 225-233.
- Stern, R., Gazit, S., El-Batsri, R. and Degani, C. 1993. Pollen parent effect on outcrossing rate, yield and fruit characteristics of 'Floridian' and 'Mauritius' lychee. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 118: 109-114.
- Tongdee, S. C. 1986. Sulfur dioxide fumigation in the storage of fresh litchi. Thailand Institute for Scientific and Technological Research, Research News (March).
- Vien, N. V., Benyon, F. H. L., Trung, H. M., Summerell, B. A., Van, N. K. and Burgess, L. W. 2001. First record of *Peronophythora litchii* on litchi fruit in Vietnam. *Australasian Plant Pathology* 30: 287-288.
- Wang, J. B., Wang, X. S. and Jin, Z. Q. 2010. Enzymatic Browning of Postharvest Litchi: a Review. *Acta Horticulturae* 863: 613-614.

- Xu, X., Wu, Z., Chen, W., and Su, M. 2005. Effect of low temperature on relative enzyme activity and membrane peroxidization of lychee fruits. *Acta Horticulturae* 665: 359-364.
- Yee, W. 1971. The Lychee in Hawaii. University of Hawaii Cooperative Extension Service and Hawaii Agriculture Experiment Station. Circular No. 366. 24 p.

CAPÍTULO II

ANTRACNOSIS (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) DE FRUTOS DE LITCHI (*Litchi chinensis* Soon.) EN OAXACA, MÉXICO.

RESUMEN

En Oaxaca, México, la antracnosis del litchi se caracterizó externa e internamente por la presencia de lesiones circulares de color café con márgenes bien definidos en el pericarpio, pero sin mostrar síntomas en el arilo ni en la semilla. En el ciclo de producción 2008-2009, la incidencia de la enfermedad en campo fue del 52% de un total de 4,220 frutos del cv Mauritius en Loma Bonita, Oaxaca, y del 3% de un total de 3,034 frutos del cv Brewster en San José Chiltepec, Oaxaca. En 2009, *Colletotrichum* sp. (51%) y *Pestalotiopsis* sp. (17%) se aislaron de 193 muestras de pericarpio sintomáticos del cv Mauritius; y solamente *Colletotrichum* sp., se aisló en PDA (39%) y en medio semi-selectivo (62%) de 102 muestras de pericarpio sintomático en 2010. *Colletotrichum* sp., no se aisló de pericarpio asintomático del cv Mauritius en ninguno de los dos años de cosecha; pero si del pericarpio asintomático del cv Brewster en 2009 (32% de 193 muestras) y 2010 (21% de 70 muestras). Sólo *Colletotrichum* sp., indujo los síntomas de la enfermedad en laboratorio (17 de 20 frutos inoculados) y en campo (19 de 20 frutos inoculados). El hongo se identificó morfológica y molecularmente como *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Palabras clave: Brewster, Mauritius, patogenicidad, incidencia, PCR.

ABSTRACT

In Oaxaca, Mexico, anthracnose of litchi fruits was characterized by internal and external brown circular lesions with well-defined margins on the pericarp, but not symptoms were observed on the aril or seed. Anthracnose field incidence was 52% in Mauritius fruits in Loma Bonita, and 3% in Brewster fruits in San Jose Chiltepec, Oaxaca in the 2008–2009 harvesting cycles. *Colletotrichum* sp. (51%) and *Pestalotiopsis* sp. (17%) were isolated from 193 symptomatic fruit pericarp samples of cv Mauritius in 2009. *Colletotrichum* sp. was isolated on PDA (39%) and on semi-selective medium (62%) from 102 symptomatic Mauritius fruit pericarp samples in 2010. *Colletotrichum* sp. was not isolated from asymptomatic Mauritius samples; however it was isolated from asymptomatic pericarp Brewster samples in 2009 (32% of 193 samples) and 2010 (21% of 70 samples). *Colletotrichum* sp. induced the anthracnose disease under laboratory (17 out of 20 inoculated fruits) and field (19 out of 20 inoculated fruits) conditions. The fungus was identified as *Colletotrichum gloeosporioides* Penz based on morphological and molecular analyses.

Keywords: Brewster, Mauritius, pathogenicity, incidence, PCR.

1. INTRODUCCIÓN

El litchi (*Litchi chinensis* Soon) es un fruto subtropical (Coates *et al.* 1994) nativo del sur de China y sureste de Asia (Menzel, 1984). Su pericarpio es delgado y áspero (Menzel y Simpson, 1994; Nacif *et al.* 2001), y al madurar es de color rojo, textura rugosa y con coartaduras debido a la presencia de braquiesclereidas, cuya función podría estar asociada con la protección contra daños mecánicos o estrés fisiológico (Nacif *et al.* 2001). El arilo o pulpa comestible es de color blanco y recubre una semilla de color marrón oscuro (Menzel y Simson, 1994).

Los principales problemas en la producción de litchi se deben a los rendimientos bajos e irregulares asociados a la caída excesiva de frutos (Chen y Huang, 2001; Ghosh, 2001; Mitra, *et al.* 2005); a la oxidación del fruto y coartadura del pericarpio (Chen y Huang, 2001; Ghosh, 2001; Huang *et al.* 2001; Pereira y Mitra, 2004; Xu *et al.* 2005); a los daños por plagas causados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Campbell y Campbell, 2001; Chen y Huang, 2001), *Peronophythora litchii* Chen Ex Ko; *Tessaratomya papillosa* Drury y *Dasineura* sp., (Chen y Huang, 2001), y a los elevados costos en cosecha y empaque (Ghosh, 2001; Xu *et al.* 2005).

En Oaxaca, México, los cultivares Brewster y Mauritius se explotan comercialmente en la región del Papaloapan y Bajos Mixes, respectivamente. En ambos cultivares, uno de los principales problemas que se presentan en condiciones de campo y postcosecha es la presencia una mancha café en el pericarpio. Los síntomas en campo se caracterizan por lesiones circulares cafés y secas en el pericarpio; el arilo y semilla del fruto no muestran daño. No se han encontrado registros de su causa o importancia en México; sin embargo, productores de la entidad reportan daños hasta del 50% en la

producción. Por la importancia socioeconómica del problema, el objetivo de esta investigación fue determinar la etiología y distribución del manchado café del pericarpio en frutos de litchi en Oaxaca, México.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en huertos comerciales de litchi en tres municipios de Oaxaca, México durante los ciclos de producción 2008-2010. Los cultivares Brewster y Mauritius se evaluaron en San José Chiltepec ($17^{\circ}57'57.92''$ N y $96^{\circ}10'11.68''$ O) y en San Juan Cotzocón ($17^{\circ}26'07.74''$ N y $95^{\circ}19'53.97''$ O) y Loma Bonita ($17^{\circ} 58'53.1''$ N y $95^{\circ}50'58.1''$ O), respectivamente.

2.1 Síntomas y caracterización del hongo

Cien frutos en madurez comercial de cada cultivar con pericarpio manchado (infección natural) y 100 frutos asintomáticos se colectaron de 25 árboles en campo en mayo de 2009. Los frutos se lavaron con agua y jabón en el laboratorio de Enfermedades de frutales del Colegio de Postgraduados, se secaron a temperatura ambiente y se seccionaron longitudinalmente. La consistencia, forma y color de los síntomas se evaluaron en pericarpio, arilo, semilla y pedúnculo; así como la presencia de halo clorótico y signos de microorganismos asociados.

Con el objetivo de caracterizar aislamientos de hongos, 123 frutos sintomáticos y 195 asintomáticos del cv Brewster se cosecharon en 2008-2009, y 60 y 70 en 2009-

2010. Además, 193 frutos sintomáticos y 72 asintomáticos del cv Mauritius se muestrearon en 2008-2009, y 102 y 96 en 2009-2010.

De cada fruto se disectaron dos fragmentos de pericarpio y arilo de aproximadamente 1.5 cm². Los fragmentos se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1.5% por 3 min, se enjuagaron tres veces en agua destilada por 1 min, se secaron en toallas de papel estéril y se incubaron en papa-dextrosa-agar (PDA, Bioxon[®]) y en un medio semiselectivo (19.5 g de PDA (Bioxon[®]), 7.5 g de agar (Merck[®]), 8 mg de iprodiona, 20 mg de triadimefón, 50 mg de cloranfenicol (Merck[®]) y 200 mg de estreptomicina) para aislamientos de *Colletotrichum* (sólo en 2009-2010) (Davis, 2003). Los fragmentos de tejido se incubaron por 5-7 días a 25 °C bajo luz fluorescente. El crecimiento de los hongos se purificó por punta de hifa y cultivos monoconidiales.

De quince frutos sintomáticos se disectó el pericarpio; las muestras se desinfectaron como se describió previamente y se colocaron dentro de bolsas de plástico con papel húmedo para inducir esporulación. La presencia de signos se monitoreó durante ocho días y de aquellos tejidos en donde hubo crecimiento micelial y esporulación se hicieron preparaciones temporales para identificación de hongos.

2.2 Pruebas de patogenicidad

Colletotrichum, *Pestalotiopsis*, *Fusarium* y *Lasiodiplodia* se aislaron de las muestras de pericarpio sintomático de ambos cultivares. De cada hongo se seleccionó un aislamiento tipo en base a morfología colonial, para evaluar su patogenicidad en laboratorio y campo.

La patogenicidad se evaluó en laboratorio en 20 frutos asintomáticos con madurez comercial del cv Mauritius colectados de campo en mayo de 2010. Los frutos se desinfectaron como se describió anteriormente y se les hizo una herida (1 mm de profundidad) con una aguja de disección estéril. Sobre cada herida se colocó un disco de agar de 0.5 cm de diámetro con crecimiento micelial de *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium* o *Lasiodiplodia* (Johnson y Cooke, 2002). El tratamiento testigo consistió de 20 frutos desinfectados y con una herida sobre la que se colocó un disco de agar sin micelio. Los frutos inoculados se mantuvieron en condiciones de cámara húmeda a 28 °C \pm 2 por 7 días. Las observaciones de síntomas se realizaron cada 24 h.

En campo, la patogenicidad de cada hongo se evaluó en 20 frutos del cv Mauritius en dos fases de desarrollo: inicio de madurez (mayo) y madurez comercial (junio de 2010). Los frutos se desinfectaron con alcohol etílico al 70% y se les hizo una incisión con una aguja estéril en la sección media y en la base del pedúnculo. Los frutos se inocularon de manera individual en la tarde (18:00 - 20:00 hora del centro) por inyección de 0.5 mL de una suspensión conidial (1×10^6 conidios.mL⁻¹) de *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* o agua destilada estéril (tratamiento testigo) (Dinh *et al.* 2003). Las heridas inoculadas se cubrieron con algodón húmedo estéril por 24 h para crear condiciones de alta humedad y favorecer el crecimiento de los hongos. El desarrollo de los síntomas se registró durante 15 días. De tejidos infectados en laboratorio y campo se hicieron reaislamientos en PDA para verificación de los postulados de Koch.

2.3 Caracterización morfológica del patógeno

De los 256 aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos de frutos sintomáticos, se seleccionaron cuatro con base a su crecimiento micelial y producción de esporas, y se designaron como M26, M28, M29 y M30. Los cultivos monoconidiales de estos aislamientos se utilizaron para la identificación de género (Barnett y Hunter, 2006; Sutton, 1980 y Hanlin 1990) y especie (Sutton, 1980; Smith y Black, 1990; Photita, *et al.* 2005; Hide *et al.* 2009 y Yang *et al.* 2009).

El tamaño y forma de 100 conidios, tamaño de apresorios y células conidiogénicas se caracterizaron en preparaciones temporales en agua. La formación de apresorios se indujo con la técnica de cultivo en cubreobjetos, en la cual 10 mm² de PDA se colocaron sobre un portaobjetos dentro de una caja Petri vacía. El borde del agar se inoculó con esporas y se cubrió con un cubreobjetos estéril (Johnston y Jones, 1997). Después de 7 días, se registró la forma y tamaño de los apresorios formados en la parte inferior del cubreobjetos.

La tasa de crecimiento de M26 y M28-30 se determinó por incubación en PDA a 28 °C por 7 días. Los resultados se analizaron estadísticamente ANOVA (α : 0.05) y se agruparon por pruebas de Tukey.

2.4 Identificación molecular

El ADN se extrajo de cultivos monocoidiales de M26 y M28-M30 de cinco días de crecimiento según el método AP (Sambrook y Russel, 2001). La integridad del ADN se

verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 80 volts por 40 min en buffer TBE y teñido con bromuro de etidio.

Las regiones ITS1 e ITS2 se amplificaron por PCR con los iniciadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (Wite *et al.* 1990), los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 580 pares de bases (pb). Para la identificación y confirmación de especie, el ADN se amplificó con el iniciador ITS4 en combinación con el iniciador específico CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') (Mills *et al.* 1992), los cuales generan un fragmento de aproximadamente 450 pb (Freeman *et al.* 2000).

La PCR se realizó en un termociclador (Applied Biosystems™ 2720), en una reacción de 25 µl [1.0 µl de cada iniciador (10 mM), 1.0 µl de dNTP (10 mM), 5 µl de Buffer de PCR 10X, 2.5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl de Taq Polymerasa, 0.5 µl de ADN molde y 13.5 µl de agua libre de nucleasas]. Reacciones de amplificación sin ADN templado se utilizaron como control negativo.

La PCR consistió de una desnaturalización inicial de un ciclo de 95° C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 1 min, 57 °C por 1 min y 72 °C por un min, con una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador con luz UV.

Los productos de PCR de los cuatro aislamientos se purificaron con el kit QUIAGEN DNeasy y se secuenciaron en un secuenciador automático 3730XL. Las secuencias se alinearon con secuencias depositadas en el banco de genes y la

homología se determinó en el servidor del National Center for Biological Information (NCBI, 2011).

2.5 Incidencia del manchado de litchi en huertos comerciales

La incidencia (%) de la enfermedad se evaluó en dos huertos comerciales en los municipios de San José Chiltepec (cv Brewster) y Loma Bonita (cv Mauritius), Oaxaca.

En el centro de cada huerto se evaluaron 100 plantas en 10 hileras continuas con 10 árboles en producción por cada una. De cada árbol se seleccionó y evaluó un racimo de frutos en madurez comercial por orientación cardinal para estimar la incidencia por orientación cardinal/árbol y huerto. Se estimó el coeficiente de Pearson (r) a partir de valores de incidencia y orientación cardinal de los racimos de frutos.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización de síntomas

El exocarpo del cv Brewster mostró una lesión café oscura, poco definida y sin halo clorótico (Figura 1A). En el endocarpo se observó una lesión de color café oscuro, circular, semi-húmeda, hundida y sin halo clorótico (Figura 1B). El síntoma externo en el cv Mauritius consistió en una lesión café oscuro, definida y con halo clorótico (Figura 1D). En el endocarpo se identificó una mancha café oscura, seca, no deprimida y bien definida (Figura 1E). En ninguno de los frutos de ambos cultivares se observaron daños en arilo, semilla o pedúnculo, ni signos de microorganismos (Figura 1C y 1F).

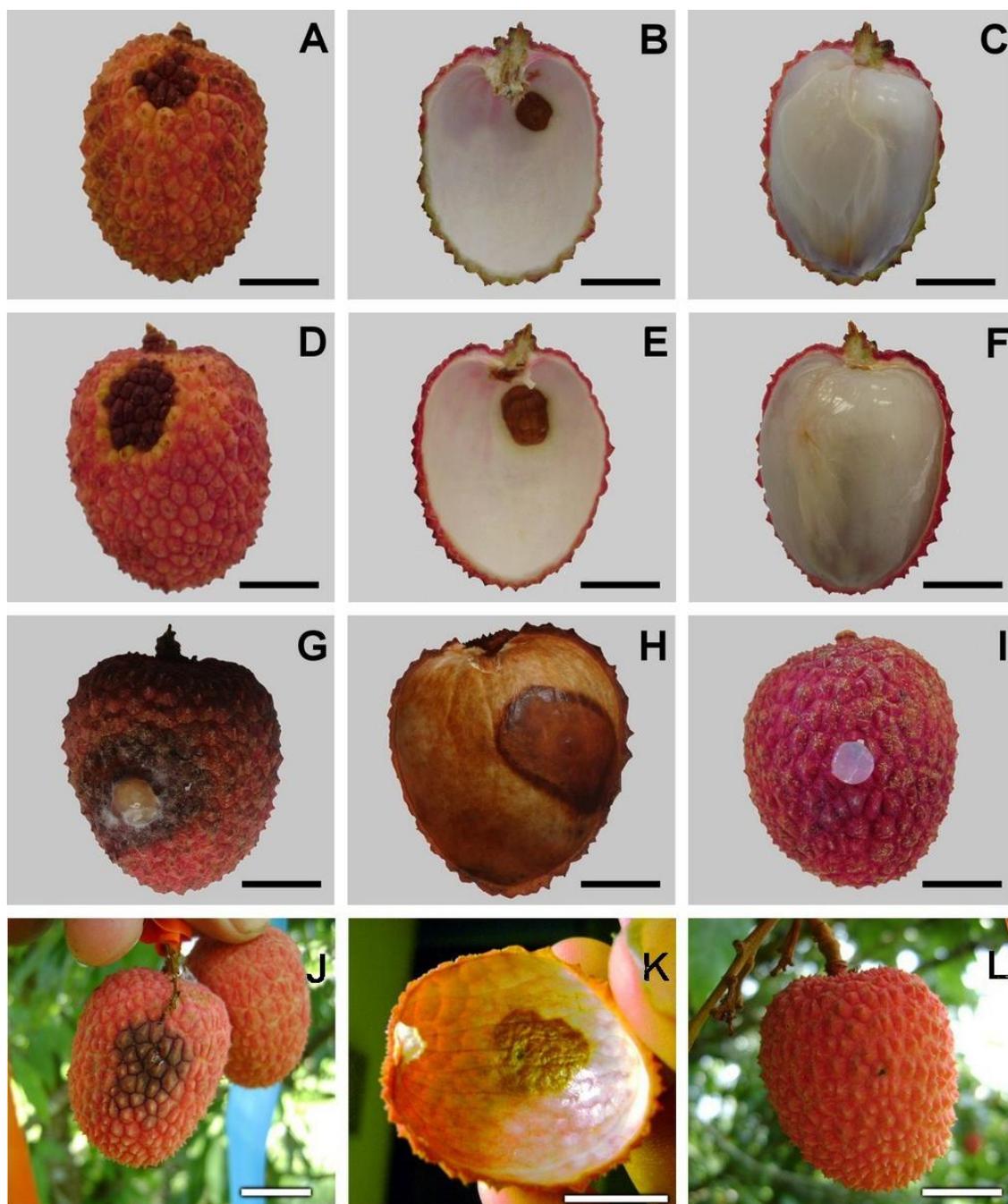


Figura 1. Frutos de litchi (*Litchi chinensis* Soon) cv Brewster (A-C) y Mauritius (D-F). Lesiones café oscuras y circulares en el Exocarpo (A y D) y Endocarpo (B y E). Arilo asintomático (C y F). Patogenicidad de *C. gloeosporioides* en frutos de litchi cv Mauritius, en laboratorio: Síntomas en exocarpo (G), y endocarpo (H), frutos testigo (I). Patogenicidad en frutos de litchi cv Mauritius, en campo: síntomas en exocarpo (J) y endocarpo (k), frutos testigo (L). Barra= 1 cm.

3.2 Aislamiento de hongos

En el ciclo de producción 2008-2010, los principales géneros que se aislaron de pericarpio sintomático de los cultivares Brewster y Mauritius fueron *Colletotrichum* (256/640 aislamientos, 40%) y *Pestalotiopsis* (71/640 aislamientos, 11%).

Colletotrichum y *Pestalotiopsis* se aislaron de pericarpios sintomáticos (54 y 31 aislamientos, respectivamente) y asintomáticos (84 y 11 aislamientos, respectivamente) del cultivar Brewster. El mayor número de aislamientos de *Colletotrichum* se obtuvieron en el ciclo 2008-2009 (94 aislamientos) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Géneros de hongos aislados de frutos de litchi cv Brewster con y sin síntomas de antracnosis en San José Chiltepec Oaxaca.

Ciclo producción	Tejido	Muestras	Medio de aislamiento	Género	Aislamientos	
					#	%
2008-2009	Pericarpio-Antracnosis	123	PDA	<i>Colletotrichum</i>	32	26
				<i>Pestalotiopsis</i>	18	15
				<i>Fusarium</i>	3	2
	Arilo-Antracnosis	123	PDA		0	0
	Pericarpio-Asintomático	193	PDA	<i>Colletotrichum</i>	62	32
				<i>Lasiodiplodia</i>	19	10
				<i>Pestalotiopsis</i>	2	1
	Arilo-Asintomático	193	PDA		0	0

2009-2010	Pericarpio-Antracnosis	60	PDA	<i>Pestalotiopsis</i>	10	16
				<i>Colletotrichum</i>	4	6
			Semi-selectivo	<i>Colletotrichum</i>	18	30
				<i>Lasiodiplodia</i>	9	1
				<i>Pestalotiopsis</i>	3	5
				<i>Fusarium</i>	1	2
	Arilo-Antracnosis	60	PDA		0	0
			Semi-selectivo		0	0
	Pericarpio-Asintomático	70	PDA	<i>Colletotrichum</i>	15	21
				<i>Pestalotiopsis</i>	8	11
				<i>Lasiodiplodia</i>	1	1
			Semi-selectivo	<i>Colletotrichum</i>	7	10
				<i>Pestalotiopsis</i>	1	1
	Arilo-Asintomático	70	PDA		0	0
Semi-selectivo				0	0	

En el cultivar Mauritius, *Colletotrichum* spp., fue el principal hongo que se aisló de pericarpios sintomáticos (202 aislamientos de 401 frutos) en los ciclos de producción 2008-2009 y 2009-2010; pero no de tejidos asintomáticos. En el ciclo 2009-2010, el mayor número de aislamientos de *Colletotrichum* se obtuvieron en los fragmentos de pericarpio sintomáticos incubados en medio semiselectivo (Cuadro 2). Los aislamientos de este género esporularon al cuarto día en el medio semiselectivo y entre 8-12 días en PDA.

Cuadro 2. Géneros de hongos aislados de frutos de litchi cv Mauritius con y sin síntomas de antracnosis en San Juan Cotzocón Oaxaca.

Ciclo de producción	Tejido	Muestras	Medio de aislamiento	Género	Aislamientos	
					#	%
2008-2009	Pericarpio-Antracnosis	193	PDA	<i>Colletotrichum</i>	99	51
				<i>Pestalotiopsis</i>	33	17
				<i>Fusarium</i>	10	5
				<i>Lasiodiplodia</i>	7	4
	Arilo-Antracnosis	193	PDA		0	0
	Pericarpio-Asintomático	72	PDA	<i>Fusarium</i>	4	5
Arilo-Asintomático	72	PDA		0	0	
2009-2010	Pericarpio-Antracnosis	102	PDA	<i>Colletotrichum</i>	40	39
				<i>Lasiodiplodia</i>	9	9
				<i>Pestalotiopsis</i>	3	3
				<i>Fusarium</i>	1	1
			Semi-selectivo	<i>Colletotrichum</i>	63	62
				<i>Lasiodiplodia</i>	9	9
				<i>Pestalotiopsis</i>	4	4
	Arilo-Antracnosis	102	PDA		0	0
			Semi-selectivo		0	0
	Pericarpio-Asintomático	96	PDA	<i>Fusarium</i>	4	4
				<i>Lasiodiplodia</i>	20	21
				<i>Pestalotiopsis</i>	10	10
			Semi-selectivo		0	0
			Arilo-Asintomático	96	PDA	
Semi-selectivo		0			0	

Los géneros *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis* y *Fusarium* también se aislaron de pericarpios sintomáticos y asintomáticos. No se aislaron microorganismos de fragmentos de arilo incubados en ambos medios de cultivo (Cuadros 1 y 2).

En 13 de 15 secciones de pericarpio incubadas en cámara húmeda hubo esporulación al quinto día. Las masas de conidios de color salmón se identificaron morfológicamente como *Colletotrichum* sp.

3.3 Pruebas de patogenicidad

En laboratorio, 85% de los frutos inoculados con *Colletotrichum* sp. mostraron síntomas en pericarpio similares a los observados en campo. Los síntomas iniciaron 72 h después de la inoculación como una lesión pequeña de color café claro, con crecimiento circular (Figura 1G). En el endocarpo se observó una lesión de color café oscura, circular y semi-húmeda (Figura 1H). En frutos testigo (Figura 1I) ni en frutos inoculados con *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. o *Lasiodiplodia* sp. se desarrollaron síntomas.

En campo, la reproducción de síntomas en el cv Mauritius se desarrolló solamente en los frutos inoculados en la sección media. El porcentaje de frutos en donde se desarrollaron los síntomas fue del 95% y 90% en los meses de mayo y junio, respectivamente. Los síntomas se observaron ocho días posteriores a la inoculación como lesiones de color café oscuro y sin signos de microorganismos (Figura 1J). El síntoma interno fue una lesión café oscura, circular, hundida y sin halo clorótico

(Figura 1K). Los frutos testigo (Figura 1L) y frutos inoculados con *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. o *Lasiodiplodia* sp. no mostraron síntomas.

El aislamiento que indujo los síntomas de antracnosis en condiciones de laboratorio y campo se reaisló e identificó morfológicamente como *C. gloeosporioides* (Sutton, 1980).

3.4 Caracterización e identificación del patógeno

Los 256 aislamientos de *C. gloeosporioides* desarrollaron colonias morfológicamente diferentes. La mayoría formaron colonias con escaso crecimiento micelial, ligeramente algodonosas y de color blanco a gris pálido. Se produjeron abundantes masas de conidios de color naranja brillante en círculo concéntricos. Otros aislamientos desarrollaron colonias de color blanco y con muy pocas masas de conidios próximas al punto de transferencia (Figura 2A, D, G y J).

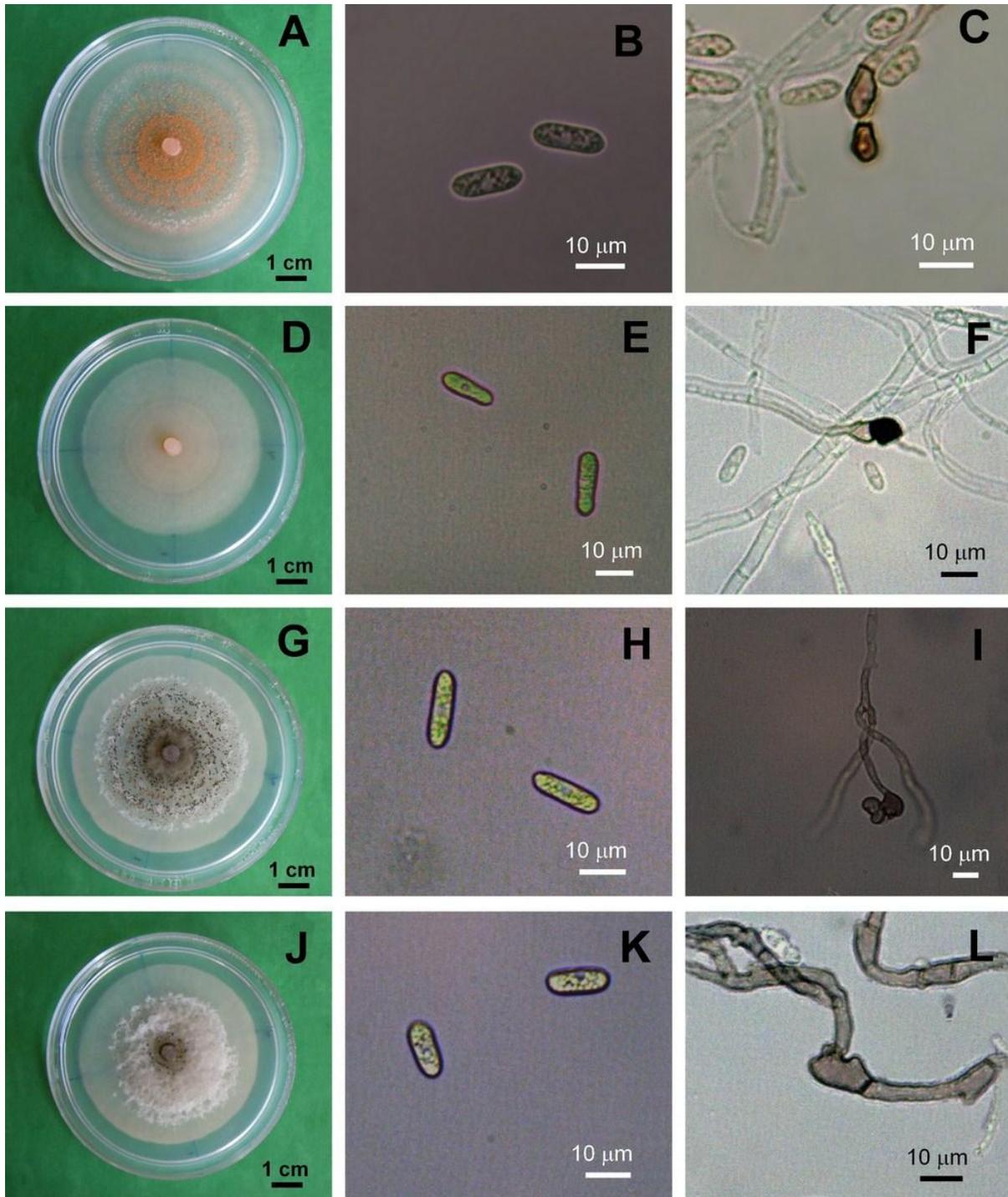


Figura 2. Crecimiento micelial (A, D, G, J) conidios (B, E, H, K) y apresorios (C, F, I, L) de los aislamientos M26 y M28-30, de *C. gloeosporioides* obtenidos de frutos de litchi infectados naturalmente.

Lo aislamientos M26 y M28-M30 formaron conidios cilíndricos (Figura 2B, 2E, 2H y 2K). Los conidios de M26 fueron estadísticamente más largos que los de M28, los cuales tuvieron el mayor diámetro (Cuadro 3). Los cuatro aislamientos formaron apresorios clavados a partir de micelio y tubos germinativos (Figura 3C, F, I y L). Las tasas de crecimiento de los cuatro aislamientos a 28 °C en PDA no fueron diferentes ($\alpha= 0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características conidiales y tasa de crecimiento micelial en PDA de los aislamientos M26 y M8-30 de *C. gloeosporioides* obtenidos de frutos de litchi con síntomas de antracnosis en San José Chiltepec y Loma Bonita, Oaxaca (ciclo 2009-2010).

Aislamiento	Longitud (μm)			Diámetro (μm)			Crecimiento micelial ($\text{mm}\cdot\text{day}^{-1}$) PDA/28 °C
	Min	Max	Media ^z	Min	Max	Media ^z	Media ^z
M26	11.1	20.8	15.7 ^a	3.4	6.6	4.9 ^b	10.74 ^a
M28	11.4	17.2	14.4 ^b	4.2	7.1	5.6 ^a	8.41 ^a
M29	11.5	17.8	15.0 ^{ab}	3.7	5.7	4.8 ^b	9.52 ^a
M30	11.0	17.4	14.9 ^{ab}	4.0	5.8	4.7 ^b	9.34 ^a

^z Valores con la misma letra en cada columna son iguales estadísticamente, Tukey ($P \leq 0.05$)

3.5 Identificación molecular

Los iniciadores ITS4-CgInt generaron un producto de aproximadamente 450 pb en los aislamientos M26 y M28-30 de *C. gloeosporioides* (Figura 3). Las secuencias de estos productos de amplificación se alinearon y compararon con las existentes en el GenBank y mostraron una homología del 95, 100, 99 y 99% con *C. gloeosporioides*, respectivamente (gb/HM016794.1; gb/JF487788.1; gb/JF487788.1; gb/FJ755268.1) (NCBI 2011).

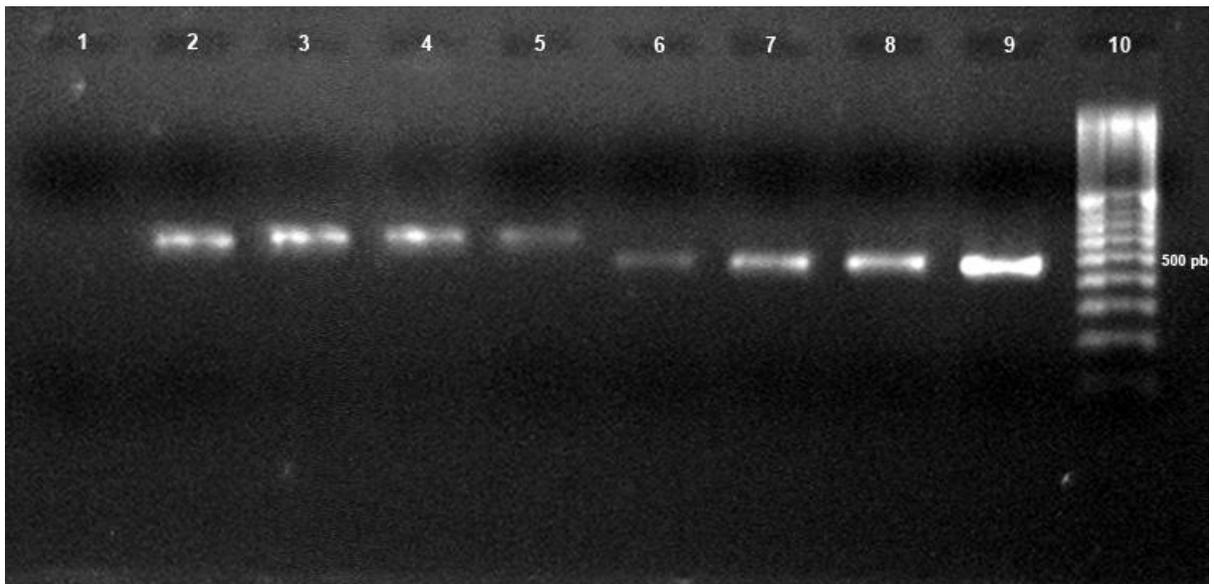


Figura 3. PCR de los aislamientos M26 y M28-30 de *C. gloeosporioides*. Línea 1 testigo (H₂O PCR); líneas 2-5 productos de amplificación generados con el par de iniciadores ITS4/ITS5; líneas 6-9 productos de amplificación generados con el par de iniciadores ITS4-CgInt. Líneas 2 y 6: M26, líneas 3 y 7: M28, líneas M29 y 9: M30, línea 10 marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™).

3.6 Incidencia de antracnosis en huertos comerciales

La antracnosis se observó en el 3% de los frutos evaluados (91/3,034) del cultivar Brewster en San José Chiltepec y en el 52% de los frutos (2,194/4,220) del cultivar Mauritius en Loma Bonita, Oaxaca ($\alpha= 0.05$). En ambos cultivares no hubo relación significativa entre la incidencia de la antracnosis y la ubicación cardinal del racimo dentro del árbol (Mauritius: $r = -0.0595$ y Brewster: $- 0.17448$).

4. DISCUSIÓN

C. gloeosporioides fue el agente causal de la antracnosis en precosecha de frutos de litchi de los cultivares Brewster y Mauritius en Oaxaca, México. El hongo se aisló de frutos infectados natural y artificialmente en ambos cultivares; en PDA formó micelio de textura ligeramente algodonosa, de color blanco a gris pálido y desarrolló masas de conidios de color salmón. Los síntomas en los frutos inoculados fueron muy similares a los observados en campo con infección natural. La antracnosis del litchi también se considera como una enfermedad en postcosecha (Coates *et al.* 1994, Liu *et al.* 2006, Liu *et al.* 2003 y Snowdon 1990) que resulta de infecciones latentes (Li *et al.* 2005). En Australia, *C. gloeosporioides* se reportó también como agente causal de la pudrición del pedúnculo y de la *mancha pimienta* en frutos de litchi bajo condiciones de campo

Colletotrichum también se aisló de frutos asintomáticos del cultivar Brewster (84/333 aislamientos, 25%). La presencia del hongo en tejido asintomático también se ha reportado en flores y frutos inmaduros del cultivar *Black leaf* (Ann *et al.* 2004). Esos frutos maduros cosechados y almacenados desarrollaron el síntoma de antracnosis,

por lo que los investigadores sugirieron que este patógeno ataca los frutos de litchi a través de infecciones latentes. En la presente investigación consideramos la probable naturaleza endofítica de *C. gloeosporioides* en el campo.

Otras causas del obscurecimiento del pericarpio de litchi en postcosecha son la pérdida de humedad debido a la desecación del pericarpio (Chen y Hong, 1992; Underhill y Critchley, 1993), degradación de antocianinas y oxidación de sustratos fenólicos por acción de las enzimas polifenol oxidasa (Li y Yan, 1963; Underhill y Critchley, 1993) y/o peroxidasa (Huang *et al.* 1990; Zauberman *et al.* 1991; Zhang y Quantick, 1997).

Las especies de *Colletotrichum* no se pueden identificar con base en su gama de hospederos (Sutton, 1980, 1992), por lo que la identificación y caracterización de los aislamientos obtenidos en este estudio se realizaron con base en sus características morfológicas (Gunnell y Gubler, 1992; Smith y Black, 1990; Sutton, 1992). Bajo estos criterios, se seleccionaron a los aislamientos M26 y M28-30, cuyo patrón de crecimiento micelial fue similar al descrito por Álvarez (1949), pero también al de *C. fragariae* cultivado en PDA (Smith y Black, 1990; y Gunnell y Gluber, 1992). Sin embargo, las colonias de *C. fragariae* en medio de harina maíz, harina de avena o frijol lima-agar son oscuras con círculos concéntricos y masas de conidios color rosa (Brooks, 1931). Además, el tamaño promedio de los conidios de M26 y M28-30 fueron más cortos y más anchos que los reportados para *C. fragariae* (Smith y Black, 1990; Gunnell y Gubler, 1992; Nirenberg *et al.* 2002).

La identificación molecular de los aislamientos M26 y M28-30 corroboró que se trata de la especie *C. gloeosporioides*. Las secuencias de los fragmentos amplificados por los iniciadores ITS4-CgInt presentaron una similaridad de 95-100% con las secuencias reportadas para esta misma especie en el banco de genes (Freeman *et al.* 2000).

No se observó relación entre la incidencia de la enfermedad y la ubicación de los frutos en los cuatro puntos cardinales, lo que coincidió con Li *et al* (2005).

5. CONCLUSIONES

C. gloeosporioides indujo los síntomas de antracnosis en frutos de litchi en precosecha.

La enfermedad se caracterizó por lesiones circulares, oscuras y secas en el exocarpo y endocarpo, pero no en el arilo ni en la semilla.

En infecciones naturales, los frutos del cultivar Brewster fueron menos susceptibles (3%) que los de Mauritius (52%).

No se observó relación entre la incidencia de antracnosis y la ubicación de los frutos en los cuatro puntos cardinales.

Este es el primer reporte de *C. gloeosporioides* como el agente causal de la antracnosis de frutos de litchi (*Litchi chinensis*) en precosecha en Oaxaca, México.

6. REFERENCIAS

- Álvarez, G .L. A. 1949. Anthracnose of the *Annonaceae* in Puerto Rico. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. 33: 27-43.
- Ann, P. J., Tsai, J. N., Wang, I. T. and Young, H. R. 2004. Litchi fruit anthracnose and the cause of black skin. *Plant Pathology Bulletin*. 13: 299-308.
- Barnett, L. H., and Hunter, B. B. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Ed. The American Phytopathological Society Press, Minnesota.
- Brooks, A. N. 1931. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*, n. sp. *Phytopathology*. 21: 739-744.
- Campbell, R. J. and Campbell, C. W. 2001. Evaluation and introduction of lychee cultivars in South Florida, USA. *Acta Horticulturae*. 558: 119-123.
- Chen, H. J. and Hong, Q. Z. 1992. A study on the senescence and browning in the pericarp of litchi (*Litchi chinensis* Sonn) during storage. *Acta Horticulturae Sinica*. 19: 227-232.
- Chen, H. and Huang, H. 2001. China litchi industry: development, achievements and problems. *Acta Horticulturae*. 558: 31-39.
- Coates, L. M., Johnson, G. I., Sardud, U. and Cooke, A. W. 1994. Postharvest Diseases of Lychee in Australia, and Their Control. In: Johnson, G. L. and Highley, E. (Eds.), Development of Postharvest Handling Technology for Tropical Tree Fruits: A Workshop Held in Bangkok, Thailand, 16-18 July 1992, pp. 68-69.
- Cooke, T., Persley, D. and House, S. 2009. Diseases of Fruit Crops in Australia. CSIRO Publishing, Queensland.

- Davis, M. J. 2003. Lychee Anthracnose Inoculum Sources. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 116: 12-15.
- Dinh, S. Q., Chongwungse, J., Pongam, P., Sangchote, S. 2003. Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology*. 32: 533-538.
- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M. and Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*. 90: 608-614.
- Ghosh, S. P. 2001. Word trade in litchi: past, present and future. *Acta Horticulturae*. 558: 23-29.
- Gunnell, P. S. and Gubler, W. D. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic on strawberry. *Mycologia*. 84: 157-165.
- Hanlin, R. T. 1990. Illustrated Genera of Ascomycetes. Volume I. American Phytopathological Society Press, Minnesota.
- Hide, K. D., Cai, L., Cannon, P. F., Crouch, J. A., Crous, P. W., Damm, U., Goodwin, P. H., Chen, H., Johnson, P. R., Jones, E. B. G., Liu, Z. Y., McKenzie, E. H. C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S. R., Pfenning, L. H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R. G., Tan, Y. P., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Yang, Y. L. and Zhang, J. Z. 2009. *Colletotrichum* – names In current use. *Fungal Diversity*. 39: 147-182.
- Huang, P. Y., Hart, H., Lee, H. and Wicker, L. 1990. Enzymatic and color changes during postharvest storage of lychee fruit. *Journal of Food Science*. 55: 1762-1763.

- Huang, X., Li, J., Wang, H., Huang, H. and Gao, F. 2001. The relationship between fruit cracking and calcium in litchi pericarp. *Acta Horticulturae*. 558: 209-215.
- Johnson, G. I. and Cooke, A. W. 2002. Postharvest disease control in Lychee. *Acta Horticulturae*. 575: 705-715.
- Johnston, P. R. and Jones, D. 1997. Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*. 89: 420-430.
- Li, M. Q. and Yan, J. L. 1963. A study of polyphenol oxidase in litchi pericarp. *Acta Botanica Sinica*. 11: 329-336.
- Li, X., Liu, A. and Chen, W. 2005. Studies on development and control of Anthracnose of lychee fruit before and after harvest. *Acta Horticulturae*. 665: 409-413.
- Liu, A., Chen, W. and Li, X. 2006. Developments of anthracnose on harvested litchi fruits and the effects of the disease on storage of the fruits. *Acta Phytopathologica Sinica*. 33(4): 351-356.
- Liu, A., Chen, W. and Li, X. Y. 2003. Biological characteristics of the pathogenic fungus causing anthracnose of litchi. *Acta Phytopathologica Sinica*. 33(4): 313-316.
- Menzel, C. M. 1984. The pattern and control of reproductive development in lychee: A Review. *Scientia Horticulturae*. 22: 333-345.

- Menzel, C. M. and Simpson, D. R. 1994. Lychee. In: Schaffer, B., Andersen, P.C., (Eds.), Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops. Boca Raton: CRC. 2: 123-145.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 98: 137-144.
- Mitra, S. K., Pereira, L. S., Pathak, P. K. and Majumdar, D. 2005. Fruit abscission pattern on lychee cultivars. *Acta Horticulturae*. 665: 215-218.
- Nacif, S. R., Paoli, A. A. S. and Salomão, L. C. C. 2001. Morphological and anatomical development of the litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn. cv. Brewster). *Fruits* (Paris). 56(4): 225-233.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. <http://ncbi.nlm.nih.gov/>. (date 13.07.11).
- Nirenberg, H., Feiler, U. and Hagedorn, G. 2002. Description of *Colletotrichum lupini* comb. nov. in modern terms. *Mycologia*. 94: 307-320.
- Pereira, L. S and Mitra, S. K. 2004. Studies on fruit growth and development of litchi cultivars Bombai, China, Deshi and Early Large Red. *Horticultural Journal, Mohanpu*. 17(2): 115-124.
- Photita, W., Taylor, P. W. J., Ford, R., Hyde, K. D. and Lumyong, S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*. 18: 117-133.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Third edition. 1: 1.32–1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

- Smith, B. J. and Black, L. L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*. 74: 69-76.
- Snowdon, A. L. 1990. A Color Atlas of Postharvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Vol 1. Wolfe Scientific Publications.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti With Pycnidia Acervuli and Stroma. Commonwealth Mycological Institute.
- Sutton, B. C. 1992. The Genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*, In: Bailey, J. A., Jeger, M. J., (Eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, USA, pp.1-26.
- Underhill, S. J. R. and Critchley, C. 1993. Physiological, biochemical and anatomical changes in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp during storage. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 68: 327-335.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. H., White, T. J., (Eds.), *PCR Protocols*. Academic Press. pp. 315-322.
- Xu, X., Wu, Z., Chen, W. and Su, M. 2005. Effect of low temperature on relative enzyme activity and membrane peroxidization of lychee fruits. *Acta Horticulturae*. 665: 359-364.
- Yang, Y. L., Liu, Z. Y., Cai, L., Hyde, K. D., Yu, Z. N. and McKenzie, E. H. C. 2009. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. *Fungal Diversity*. 39: 123-146.

- Zauberman, G., Ronen, R., Akerman, M., Weksler, A., Rot, I. and Fuchs, Y. 1991. Postharvest retention of the red colour of litchi fruit pericarp. *Scientia Horticulturae*. 47: 89-97.
- Zhang, D. L. and Quantick, P. C. 1997. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 12: 195-02.

CAPÍTULO III

CONTROL QUÍMICO DE *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. EN FRUTOS DE LITCHI (*Litchi chinensis* Soon.) BAJO CONDICIONES *IN VITRO*.

RESUMEN

La antracnosis de frutos de litchi es causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y su control en campo se hace empíricamente con aplicaciones frecuentes de fungicidas. Su incidencia de esta enfermedad en frutos del cultivar Mauritius puede ser superior al 50% en Oaxaca, México; sin embargo no hay registros de fungicidas autorizados o efectivos para su control. En este estudio se evaluó el efecto *in vitro* de cinco fungicidas en la germinación de conidios y en el crecimiento micelial del hongo. La concentración efectiva a la cual se inhibió el 50% del crecimiento micelial o germinación de conidios (CE_{50}) se obtuvo con boscalid/pyraclostrobin a concentraciones de 0.0111 y 0.66962 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente.

Palabras clave: antracnosis, benomil, procloraz, boscalid/pyraclostrobin, cyprodinil/fludioxinil, hidróxido de cobre

ABSTRACT

Anthracoise of Litchi fruits is caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. This disease is empirically controlled in the field with fungicides. Anthracnose incidence in Mauritius fruits can exceed 50% in Oaxaca, Mexico, however there are no records of authorized or effective fungicides for its control. Five fungicides were tested *in vitro* for inhibition of mycelial growth and conidial germination of *C. gloeosporioides*. The effective concentration at which 50% of spore germination or mycelial growth was inhibited (EC_{50}) was obtained with boscalid/pyraclostrobin (0.0111 y 0.66962 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, respectively).

Keywords: anthracnose, benomyl, prochloraz, boscalid/pyraclostrobin, cyprodinil/fludioxinil, copper hydroxide

1. INTRODUCCIÓN

El litchi (*Litchi chinensis* Soon), perteneciente a la familia Sapindaceae (Menzel, 1984) es un fruto nativo del Sur de China y Norte de Vietnam (Menzel, 1984; Ghosh, 2001). Los cultivares Brewster y Mauritius se explotan comercialmente en Oaxaca, México.

La antracnosis es una de las principales enfermedades que afectan al fruto de litchi en precosecha (Nakasone y Paull, 1998) y postcosecha (McMillan, 1994). *Colletotrichum gloeosporioides* es el principal agente causal de la enfermedad, aunque *C. acutatum* también se detectó con menor incidencia en Australia (Johnson *et al.* 2002). La antracnosis del litchi es importante en Oaxaca, ya que en precosecha se ha encontrado afectando el 53% y 3% de los frutos de los cvs. Mauritius y Brewster, respectivamente.

El uso de fungicidas es importante para el manejo de la antracnosis en mango (Brent, 1995). La antracnosis del litchi en campo se controla químicamente con aplicaciones frecuentes de benomil, benomil+mancozeb (McMillan, 1994), mancozeb (McMillan, 1994; Crane *et al.* 1997) y tebuconazole (Crane *et al.* 1997). Tratamientos postcosecha con dióxido de azufre (Johnson, 1990), benomil (Huang y Scott, 1985) y procloraz (Brown *et al.* 1984) controlaron pudriciones de litchi. Hasta ahora, en México no se han registrado fungicidas autorizados para el control de la antracnosis del litchi, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de seis fungicidas en el crecimiento micelial y germinación de conidios de *C. gloeosporioides* bajo condiciones *in vitro*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos con antracnosis se colectaron en huertos comerciales de litchi cv Mauritius en los Municipios de San Juan Cotzocón (17°26'07.74" LN y 95°19'53.97" LO) y Loma Bonita (17° 58' 53.1" LN y 95° 50' 58.1" LO) Oaxaca, México durante los ciclos de producción 2008-2010.

2.1 Aislamiento e identificación de *Colletotrichum*

El aislamiento del hongo se hizo de 295 segmentos de pericarpio disectados de frutos sintomáticos. Las muestras se cultivaron en papa dextrosa agar (PDA, Bioxon[®]) y en un medio semiselectivo para *Colletotrichum* [19.5 g de PDA (Bioxon[®]), 7.5 g de agar (Merck[®]), 8 mg de iprodiona, 20 mg de triadimefón, 50 mg de cloranfenicol (Merck[®]) y 200 mg de estreptomycin] (Davis, 2003). Los aislamientos se incubaron en cajas Petri por 5-7 días a 28 °C (± 2 °C) y se purificaron mediante cultivos monoconidiales.

Cuatro aislamientos tipo (M26, M28, M29 y M30) se seleccionaron e identificaron morfológicamente a nivel de género (Barnett y Hunter, 2006) y especie (Sutton, 1980; Smith y Black, 1990; Photita, *et al.* 2005; Hide *et al.* 2009 y Yang *et al.* 2009).

La identificación molecular a nivel de especie se realizó con el DNA de cultivos monoconidiales; mediante PCR con el iniciador específico Cglnt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') (Mills *et al.* 1992) y el iniciador universal ITS4, los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 450 pb (Freeman *et al.* 2000). Los productos de PCR se purificaron, secuenciaron y alinearon para determinar su homología con las secuencias de *C. gloeosporioides* depositadas en el banco de genes (NCBI, 2011).

2.2 Patogenicidad en campo

La patogenicidad en campo se verificó mediante la inoculación de 20 frutos del cv Mauritius en madurez comercial. Los frutos se desinfestaron superficialmente con alcohol etílico al 70%. En la sección media de los frutos se hizo una herida (1 mm profundidad) con una aguja estéril para favorecer la infección (Johnson y Cooke, 2002). Una gota de inóculo del aislamiento M28 (1×10^6 conidios.mL⁻¹), se depositó sobre la herida de cada fruto (Dinh *et al.* 2003). El tratamiento testigo consistió de 20 frutos con herida e inoculados con agua destilada estéril. Las zonas inoculadas se cubrieron por 24 h con algodón húmedo para favorecer la germinación de conidios y la infección. Después de siete días de incubación se hicieron re-aislamientos en PDA.

2.3 Evaluación *in vitro* de la eficacia de fungicidas

Los fungicidas hidróxido cúprico, ciprodinil/fludioxinil, boscalid/piraclostrobin, benomil y procloraz se evaluaron bajo condiciones *in vitro*. La solución stock de cada fungicida se preparó en agua destilada estéril a una concentración de 100 y 10,000 µg de ingrediente activo (i.a)·L⁻¹ (peso/volumen).

El volumen requerido de cada solución stock se adicionó al PDA para obtener un volumen final de 100 mL y concentraciones de 5000, 1000, 100, 10 y 1 µg·L⁻¹ para el hidróxido cúprico, ciprodinil/fludioxinil y el boscalid/piraclostrobin; y de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 µg·L⁻¹ para el benomil y procloraz. Se utilizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Un disco de micelio de 5 mm de diámetro obtenido de colonias con crecimiento activo (ocho días) del aislamiento M28 (previamente evaluada su patogenicidad en

campo), se colocaron en cajas Petri con cada tratamiento, incluyendo el testigo (PDA sin fungicida) y se incubaron a 28 °C (± 2 °C) en oscuridad constante. El diámetro miceliar se evaluó diariamente hasta la cobertura total de la caja Petri en uno de los tratamientos.

La germinación de conidios se evaluó en tratamientos similares. Una alícuota de 100 μ L de conidios (10^6 conidios. ml^{-1}) del aislamiento M28 se colocó en cada tratamiento. Las cajas Petri se incubaron a 28 °C (± 2 °C) por ocho horas en oscuridad, posteriormente se conservaron en refrigerador (5 °C ± 2 °C) para detener el crecimiento de los tubos germinativos. El porcentaje de germinación se determinó en 100 conidios por tratamiento.

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño completamente al azar. En cada caja petri se midió el crecimiento miceliar del hongo con un vernier digital y posteriormente estos datos se transformaron en porcentajes de inhibición del hongo. La concentración efectiva que inhibió más del 50% (CE_{50}) del crecimiento miceliar y límites fiduciales o límites de confianza de cada fungicida se calcularon mediante el análisis PROBIT en el programa SAS®.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento e identificación del patógeno

De las 295 secciones de pericarpio que se incubaron en PDA y en medio semiselectivo, se obtuvieron 139 y 63 aislamientos de *Colletotrichum*, respectivamente. La morfología de las colonias fue variable, la mayoría formaron colonias de color blanco-grisáceo y de

textura ligeramente algodonosa, con abundantes conidios producidos en masas concéntricas de color naranja.

La forma de los conidios fue cilíndrica en M26 y M28-30; todos formaron apresorios clavados.

El par de iniciadores ITS4-CgInt generaron un producto de aproximadamente 450 pb con, con homologías del 95-100% con *C. gloeosporioides* (NCBI 2011).

3.2 Patogenicidad en campo

El síntoma de antracnosis se desarrolló a los ocho días después de la inoculación en el pericarpio del 95% de los frutos evaluados. Los frutos testigo no desarrollaron síntomas. El hongo fue reaislado e identificado morfológicamente como *C. gloeosporioides* (Sutton, 1980).

3.3 Evaluación *in vitro* de la eficacia de fungicidas

Benomil a 1 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y procloraz a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ tuvieron el mayor efecto en la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1). La concentración efectiva 50% (CE_{50}) para los dos fungicidas fue de 0.06005 para benomil y 0.09402 para procloraz (Cuadro 2).

La eficacia de boscalid/pyraclostrobin y ciprodinil/fludioxinil fue mayor ya que resultaron con una CE_{50} de 0.0111 y 0.0562, respectivamente. El hidróxido de cobre mostró inhibición de más del 50% del crecimiento micelial a concentraciones de 1000 y 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cuadro 1) con CE_{50} de 84.007. El fungicida con menor CE_{50} para el desarrollo micelial de *C. gloeosporioides* fue el boscalid/pyraclostrobin (0.0111). El

fungicida que inhibió consistente y efectiva la germinación de conidios en más del 50% fue el boscalid/pyraclostrobin a la concentración de 0.66962 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cuadro 2)

Cuadro 1. Efecto de cinco fungicidas en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* aislado de frutos de litchi cv Mauritius. Valores promedio de 4 repeticiones. Oaxaca, México. 2010

Porcentaje de inhibición de crecimiento.						
Dosis de ingrediente activo ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)						
Ingrediente activo	10	1	0.1	0.01	0.001	0
Benomil	97.674a ^z	96.487a	55.181b	10.421c	7.566d	0.0 e
Procoraz	98.592a	88.829b	33.523c	17.831d	9.920e	0.0 f
Dosis de ingrediente activo ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)						
	5000	1000	100	10	1	0.00
boscalid/pyraclostrobin	97.109a	90.329b	85.936c	88.294bc	68.439d	0.0 e
cyprodinil/fludioxinil	96.3473b	95.8599b	97.9702a	77.7289c	70.3809d	0.0 e
hidróxido de cobre	97.464a	95.869a	33.598b	11.900c	11.308c	0.0 d

^z Valores con la misma letra en cada hilera son iguales estadísticamente, Duncan ($P \leq 0.05$) y cada valor representa el promedio de las cuatro repeticiones.

Cuadro 2. Concentración efectiva de cinco fungicidas que inhibió el 50% (CE₅₀) del crecimiento micelial y germinación de conidios de *C. gloeosporioides* aislado de frutos de litchi cv Mauritius. Oaxaca, México. 2010.

Ingrediente activo	CE ₅₀ (µg i.a. · L ⁻¹)	
	[Límites fiduciales 95%]	
	Crecimiento micelial	Germinación de conidios
benomil	0.06005 [0.04336 - 0.08425]	2.57 [0.5689 – 33.5757]
procloraz	0.09402 [0.06516 - 0.13646]	20.88 [2.80248 – 1511]
boscalid/piraclostrobin	0.0111 [0.000084 - 0.11593]	0.66962 [0.34471 – 0.87285]
cyprodinil/fludioxinil	0.0562 [0.0184 - 0.1319]	7.36533 [5.37046 – 10.04890]
hidróxido de cobre	84.007 [70.8631 - 99.6478]	108.36999 [66.35722 – 179.29643]

4. DISCUSIÓN

La mayor inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* se obtuvo con benomil a dosis de 1.0 y 10 µg·L⁻¹. La concentración de benomil que inhibió el crecimiento del hongo en un 50% fue 0.06 µg·litro⁻¹, lo que indica una alta

susceptibilidad del aislamiento a benomil, por el escaso o nulo uso de fungicidas en las huertas comerciales de litchi en Oaxaca, México.

El efecto del benomil en la inhibición del crecimiento micelial (CE_{50}) de *C. gloeosporioides* en mango y su control en campo lo evaluaron previamente (Rondon *et al.* 2006 y Pathak y Shekhawat, 1976, respectivamente) y encontraron dosis mayores de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

La dosis de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de procloraz inhibió el mayor crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, lo que también indica la alta susceptibilidad del hongo por la poca presión de selección en campo. El efecto del procloraz en la inhibición del crecimiento micelial en mango lo evaluaron previamente (Rondón *et al.* 2006, y Mathews *et al.* 2009) y encontraron dosis inhibitorias de 16 y $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Con base a las pruebas realizadas en la presente investigación, las diferentes concentraciones de boscalid/piraclostrobin y ciprodinil/fludioxinil inhibieron más del 50% del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*. Sin embargo, evaluaciones previas de otros fungicidas en laboratorio y campo (Everet y Timudo, 2007) demostraron que los resultados de pruebas de laboratorio no reflejan necesariamente los resultados obtenidos en pruebas de campo.

Concentraciones efectivas de $84.007 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidróxido de cobre se requirieron para inhibir más del 50% (CE_{50}) del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, y de $108.36 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para inhibir más del 50% de la germinación de sus conidios. Al respecto, Everett y Timudo (2007) evaluaron diferentes formulaciones de cobre para inhibir el

crecimiento de un aislamiento obtenido de frutos de aguacate en Nueva Zelanda y reportaron que $2.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidrosulfato de cobre fue la formulación que inhibió más del 50% de la germinación de conidios. La menor CE_{50} para reducción de crecimiento miceliar del hongo se obtuvo con hidróxido de cobre ($257.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

5. CONCLUSIONES

Colletotrichum gloeosporioides, causante de la antracnosis de frutos de litchi, fue susceptible a los fungicidas benomyl, procloraz, boscalid/piraclostrobin, ciprodinil/fludioxinil e hidróxido de cobre. Se sugiere evaluar su efecto en pre y en postcosecha.

6. REFERENCIAS

- Barnett, L. H., and Hunter, B. B. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Ed. The American Phytopathological Society Press, Minnesota. 218 p.
- Brent, K. J. 1995. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be managed? *FRAC Monograph No.1*, 48p. Global Crop Protection Federations, Brussels.
- Brown, B. I., Scott, K. J. and Mayer, D. G. 1984. Control of fruit rots of guava, lychee and custard apple by prochloraz dips. *Singapore Journal of Primary Industries*, 12: 40-49.
- Coates, L. M., Johnson, G. I., Sardud, U. and Cooke, A. W. 1994. Postharvest diseases of lychee in Australia, and their control. In: Johnson, G.L. and Highley E. (eds) Development of postharvest handling technology for tropical tree fruits: A workshop held in Bangkok, Thailand, 16-18 July 1992: pp. 68-69.
- Crane, J. H., Sanford, R. E. and McMillan, R. T. Jr. 1997. Control of lychee anthracnose by foliar applications of tebuconazole, mancozeb, and copper hydroxide on 'Mauritius' lychee fruit under south Florida conditions. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 110: 149-152.
- Davis, M. J. 2003. Lychee anthracnose inoculum sources. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 116: 12-15.
- Everett, R. K., and Timudo, T. O. E. 2007. In vitro fungicide testing for control of avocado fruit rots. *New Zealand Plant Protection* 60: 99-103.

- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M. and Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*. 90: 608-614.
- Ghosh, S. P. 2001. Word trade in litchi: past, present and future. *Acta Horticulturae* 558: 23-29.
- Hide, K. D., Cai, L., Cannon, P. F., Crouch, J. A., Crous, P. W., Damm, U., Goodwin, P. H., Chen, H., Johnson, P. R., Jones, E. B. G., Liu, Z. Y., McKenzie, E. H. C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S. R., Pfenning, L. H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R. G., Tan, Y. P., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Yang, Y. L. and Zhang, J. Z. 2009. *Colletotrichum* – names In current use. *Fungal Diversity*. 39: 147-182.
- Huang, P. Y. and Scott, K. J. 1985. Control of rotting and browning of litchi fruit after harvest at ambient temperatures in China. *Tropical Agriculture* 62: 2-4.
- Johnson, G. I. 1990. Postharvest disease assessment: rating systems. In: Beattie, B.B. (ed.) Proceedings of the Australasian Postharvest Conference 1989. Australian Institute of Agricultural Science, Occasional Publication No. 46, pp. 107-117.
- Johnson, G. I., Cooke, A. W. and Sardud, U. 2002. Postharvest disease control in lychee. *Acta Horticulturae* 575: 705-715.
- Mathews, A. A., Thahir, B. S., Hemalatha, T. M. and Eswara, R. N. P. 2009. Evaluation on fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose- An in vitro study. *Current Biotica* 3 (3): 366-369.

- McMillan, R. T. Jr. 1994. Epidemiology and control of anthracnose of lychee. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 107: 345-346.
- Menzel, C. M. 1984. The pattern and control of reproductive development in lychee: A Review. *Scientia Horticulturae* 22: 333-345.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 98: 137-144.
- Nakasone, H. Y. and Paull, R. E. 1998. *Tropical Fruits*. CAB International, Wallingford, UK, 445 pp.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. <http://ncbi.nlm.nih.gov/>. (date 13.07.11).
- Pathak, V. and Shekhawat, P. 1976. Efficacy of some fungicides and hot water in control of anthracnose and Aspergillus rot of mango fruits. *Indian Phytopathology* 29: 315-317.
- Photita, W., Taylor, P. W. J., Ford, R., Hyde, K. D. and Lumyong, S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*. 18: 117-133.
- Rondón, O., Sanabria, de A. N., y Rondón, A. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Revista Agronomía Tropical*. 56(2): 219-235.

- Smith, B. J. and Black, L. L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*. 74: 69-76.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti With Pycnidia Acervuli and Stroma. Commonwealth Mycological Institute.
- Yang, Y. L., Liu, Z. Y., Cai, L., Hyde, K. D., Yu, Z. N. and Mckenzie, E. H. C. 2009. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. *Fungal Diversity*. 39: 123-146.