



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR,  
PATOGENICIDAD CRUZADA Y RESISTENCIA A PRODUCTOS  
QUÍMICOS EN AISLADOS DE *Colletotrichum* spp. OBTENIDOS DE  
FRUTOS DE AGUACATE A NIVEL NACIONAL**

**LETICIA ROBLES YERENA**

**T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

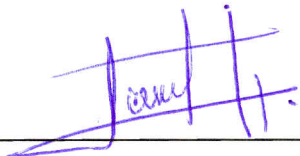
**2015**

La presente tesis, titulada: **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR, PATOGENICIDAD CRUZADA Y RESISTENCIA A PRODUCTOS QUÍMICOS EN AISLADOS DE *Colletotrichum* spp. OBTENIDOS DE FRUTOS DE AGUACATE A NIVEL NACIONAL**, realizada por el alumno (a): Leticia Robles Yerena, bajo la dirección del Consejero Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:



---

**DR. DANIEL NIETO ÁNGEL**

ASESOR:



---

**DR. DANIEL TÉLIZ ORTIZ**

ASESOR:



---

**DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ**

ASESOR:



---

**DR. J. CONCEPCIÓN RODRÍGUEZ MACIEL**

ASESOR:



---

**DR. MARIO OROZCO SANTOS**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios nuestro señor por haberme permitido concluir un objetivo más.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme el apoyo económico para concluir mis estudios de Doctorado.

Al Ing. May Bello R. de CESAVER, a la Ing. María Armida Díaz Pérez de CESAVER, al Ing. José Adalberto Barocio del CESAVER, al CESVMOR, al Dr. Jesús Orozco Santos por las muestras enviadas de Nayarit, Al Ing. Fco. Javier Marroquín Pimentel y al Ing. Eric Ramiro Merino Marroquín por el apoyo en la colecta de Michoacán.

A los integrantes de mi Comité Académico: Al Dr. Daniel Nieto Ángel, Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dr. Cristian Nava Díaz, Dr. J. Concepción Rodríguez Maciel, Dr. Mario Orozco Santos por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo, el apoyo y consejos que me brindaron mismos fueron decisivos para la conclusión de este trabajo de investigación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz y Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, con todo mi respeto y agradecimiento por sus acertadas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación. Agradezco al personal docente del programa de Fitosanidad por la aglomeración de conocimientos compartidos dentro y fuera de las aulas.

Al M. C. Jorge Zambrano Gutiérrez por su asistencia técnica en el laboratorio, apoyo y comprensión. A la M.C. Victoria Ayala Escobar por su amistad, apoyo y excelente disposición para colaborar en diversas investigaciones. A Verónica e Hilda por su amable atención y apoyo en los diversos trámites realizados en el postgrado de Fitosanidad.

A mis amigos y compañeros del postgrado de Fitopatología: Luis Alfonso Aguilar, Dolores, Laurita Chi, Alma Adela, Gabriela Pelayo, Sandra, Mirna, Daniel Barcenás, Alma Solano, Elvis, Lauro Soto, Edgar, Maricarmen, por el apoyo brindado y por su amistad.

A la Sra. Amalia, Sra. Margarita y Sra. Victoria Pérez por su apoyo, por escucharme y comprenderme cuando lo necesite.

## DEDICATORIA

No cabe duda que el realizar cualquier tipo de estudios trae grandes satisfacciones, pero también limitaciones y sacrificios; por esto dedico los logros obtenidos con mucho amor y cariño para mi pequeño Said Damián.

A mis tan amados padres Leticia y Nicolás, por apoyarme moral, económica y espiritualmente en mis éxitos y fracasos, por haber inculcado en mí todos los valores, haciendo de mí una mujer de bien, por enseñarme que después de una caída por más dura que haya sido debo levantarme.

A mis queridos hermanos Juan, María Guadalupe, Nicolás y Daniel para inspirarlo en sus futuros logros.

A mi querido abuelo Apolinar Robles Cuevas que en paz descanse, por el apoyo y cariño incondicional que siempre me brindo. A mi querida abuela Guadalupe Hernández por su amistad, amor, apoyo y comprensión.

A mi querida amiga Isabel Martínez de la Cruz por la gran y dichosa amistad que siempre en ella encontré, por saberme escuchar y cuidar cuando más necesite de alguien y por todos los momentos que hemos compartido, por enseñarme que una verdadera amistad es posible y que puede durar mucho más que cualquiera pudo haber imaginado.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
AGRADECIMIENTOS .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE CUADROS .....	x
ÍNDICE DE ANEXOS .....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Objetivos generales .....	3
Objetivos específicos .....	3
<b>Capítulo I. Patosistema <i>Persea-Colletotrichum</i></b>	
1.1 El género <i>Persea</i> .....	4
1.2 El género <i>Colletotrichum</i> .....	7
1.2.1 Importancia .....	7
1.2.2 Rango de hospederos.....	8
1.2.3 Síntomas .....	9
1.2.4 Clasificación taxonómica .....	12
1.2.5 Características .....	14
1.2.6 Identificación molecular.....	14
1.2.7 Patogénesis .....	17
1.2.8 Control.....	20
1.3 Literatura citada.....	22
<b>Capítulo II. Caracterización morfológica de <i>Colletotrichum</i> spp. aislado de frutos de aguacate en México</b>	
Resumen .....	37
Abstract .....	39
2.1. Introducción .....	40

2.2 Materiales y Métodos .....	42
2.2.1 Área de muestreo.....	42
2.2.2 Obtención de los aislados .....	42
2.2.3 Identificación morfológica y morfométrica .....	44
2.2.4 Diseño experimental.....	45
2.2.5 Identificación.....	45
2.3 Resultados y Discusión .....	46
2.4 Conclusiones .....	65
2.5 Literatura citada.....	67

**Capítulo III.** Pruebas de virulencia y patogenicidad cruzada de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Resumen .....	74
Abstract .....	75
3.1 Introducción .....	76
3.2 Materiales y métodos .....	79
3.2.1 Aislados .....	79
3.2.2 Inóculo.....	79
3.2.3 Inoculación .....	79
3.2.4 Reaislamiento .....	81
3.2.5 Variables evaluadas y diseño experimental. ....	82
3.3 Resultados y discusión .....	82
3.3.1 Patogenicidad .....	82
3.3.2 Virulencia .....	84
3.3.3 Virulencia cruzada.....	87
3.4 Conclusiones .....	91
3.5 Literatura citada.....	94

**Capítulo IV.** Diagnostico molecular de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Resumen .....	101
Abstract .....	103
4.1 Introducción .....	104
4.2 Materiales y métodos .....	106
4.2.1 Extracción de ácidos nucleicos totales .....	106
4.2.2 Amplificación vía PCR.....	107

4.2.3 Análisis de las secuencias.....	108
4.3 Resultados y Discusión .....	108
4.4 Conclusiones .....	117
4.5 Literatura citada.....	119

**Capítulo V.** Resistencia a fungicidas de aislados de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Resumen.....	125
Abstract .....	127
5.1 Introducción .....	128
5.2 Materiales y métodos .....	131
5.2.1 Aislados utilizados .....	131
5.2.2 Fungicidas .....	131
5.2.3 Preparación de medios con fungicidas para determinar la ventana biológica.....	131
5.2.4 Análisis de datos para la ventana biológica.....	132
5.2.5 Preparación de medios con fungicidas para determinar la prueba de sensibilidad .....	133
5.2.6 Aislados utilizados .....	133
5.2.7 Análisis de datos para la prueba de sensibilidad .....	135
5.3 Resultados y discusión .....	136
5.3.1 Respuesta al Tiabendazol .....	136
5.3.2 Respuesta al Propiconazol.....	138
5.3.3 Respuesta al Tebuconazol .....	141
5.4 Conclusiones .....	143
5.5 Literatura citada.....	144
 CONCLUSIONES GENERALES .....	 149

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

### Capítulo I. Patosistema *Persea-Colletotrichum*

- Figura 1. Síntomas y signos de Antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en tejido y frutos de aguacate. A) en flores, B) en brotes, C-D) en tallos, E-F) en frutos con esporulación color salmon y en G) la nervadura de las hojas..... 10

### Capítulo II. Caracterización morfológica de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

- Figura 1. Variación en color de las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Vista del anverso y reverso de colonias de color gris (A), salmón (B), café (C), oscuro (D) y blanco (E)..... 50
- Figura 2. Variación en crecimiento de micelio sobre medio de cultivo PDA de las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Vista del anverso y reverso de las colonias mostrando micelio aéreo (A), plano (B), denso (C) y escaso (D)..... 52
- Figura 3. Variación en anillamiento y borde de las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Vista del anverso y reverso de las colonias mostrando formación de anillos (A), sin formación de anillos (B), colonias de borde ondulado (C), y con borde liso o circular (D). ..... 53
- Figura 4. Variación en la esporulación las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Vista del anverso y reverso de las colonias mostrando colonias sin la formación de masas de conidios (A) y con la formación de masas de conidios (B)..... 55
- Figura 5. Variación del micelio de las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Micelio septado (A), Micelio joven sin septas aparentes (B), Micelio nucleado (C), Micelio diferenciado (D), esporodoquio con conidióforos y conidios (E) e hifas largas (F)..... 56
- Figura 6. Variación de setas presentes en las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Setas solitaria (A), Fasciculo de setas septadas mostrando la base bulbosa (B) y Produccion masiva de setas (C) ..... 57



Figura 7. Variación en peritecios, ascas y ascoporas presentes en las colonias de <i>Colletotrichum</i> aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Ascosporas (A), ascas (B), peritecios de ostiolo corto (C) y peritecios de ostiolo largo (D-F). .....	59
Figura 8. Variación en las clamidosporas presentes en las colonias de <i>Colletotrichum</i> aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Clamidosporas en cadena (A) y detalle de las clamidosporas (B).....	60
Figura 9. Variación en los conidios presentes en las colonias de <i>Colletotrichum</i> aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Conidios con ambos extremos redondeados (A-E), conidios con un extremo redondeados y uno agudo (F-G), conidios con ambos extremos agudos (H-K) y malformaciones (L).....	61
Figura 10. Variación en los apresorios formados por conidios de <i>Colletotrichum</i> aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Conidio germinado (A-B), formación de apresorios a partir de un conidio germinado (C), apresorio solitario (D), apresorios múltiples (E), apresorios lobulados (F-I), Variación de apresorios (I-K) apresorios en cadena (L). .....	63
Figura 11. Dendograma del analisis multivariado de 18 variables evaluadas en <i>Colletotrichum</i> aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Se ubican facilmente dos grandes grupos que corresponden a <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. acutatum</i> . .....	64

**Capítulo III.** Pruebas de virulencia y patogenicidad cruzada de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Figura 1. Inoculación de 300 cultivos monospóricos de <i>Colletotrichum</i> aislados de aguacate de los principales estados productores de México. Inoculación frutos de aguacate con y sin herida con discos de medio de cultivo con crecimiento fungoso (A), frutos en charolas de unicel dentro de bolsa de polietileno (B), incubación a 25°C durante siete días (C) y medición del diámetro de la lesión con ayuda de un vernier digital (D). .....	80
Figura 2. Síntomas observados en frutos de aguacate cultivar Hass después de haber sido inoculados con 300 cultivos monospóricos de <i>Colletotrichum</i> aislados de aguacate de los principales estados productores de México. Síntomas iniciales de antracnosis (A,B), síntomas de antracnosis con presencia de micelio (C), Presencia de conidios producidos directamente de la lesión en los puntos de inoculación (D-H).....	83
Figura 3. Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos en frutos de aguacate cultivar Hass previamente heridos. Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la copiosa esporulación resultado de la facilitación del proceso de infección por medio de la herida. ....	85
Figura 4. Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos en frutos de aguacate cultivar Hass sin herida. Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la esporulación. ....	85

Figura 5. Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos en frutos de aguacate cultivar Fuerte previamente heridos. Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la copiosa esporulación resultado de la facilitación del proceso de infección por medio de la herida. ....	86
Figura 6. Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos en frutos de aguacate cultivar Fuerte sin herida. Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la esporulación. ....	87
Figura 7. Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos aislados de aguacate e inoculados en frutos de plátano cultivar Cavendish con herida previa (región superior de los frutos) y sin herida previa (región inferior de los frutos). Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la esporulación en ambos tratamientos. ....	88
Figura 8. Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos aislados de aguacate e inoculados en frutos de mango cultivar Manila con herida previa (región inferior de los frutos) y sin herida previa (región superior de los frutos). Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la esporulación en ambos tratamientos. ....	89

**Capítulo IV.** Diagnostico molecular de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Figura 1. Análisis filogenético de 298 cultivos monospóricos de <i>Colletotrichum</i> aislados de aguacate con síntomas de antracnosis de los principales estados productores de México. Las secuencias fueron alineadas (Clustar W) y después procesadas mediante el procedimiento UPGMA en el programa Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). ....	116
--	-----

## ÍNDICE DE CUADROS

### Página

#### **Capítulo V.** Resistencia a fungicidas de aislados de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Cuadro 1. Aislados considerados para la obtención de la ventaba biológica de los fungicidas.....	131
Cuadro 2. Relación de los aislados de <i>Colletotrichum</i> spp., localidad, ubicación GPS, msnm, fungicidas aplicados en campo y especie obtenidas utilizados para determinar la sensibilidad in vitro a thiabendazol, propiconazol y tebuconazol. ....	134
Cuadro 3. Sensibilidad al fungicida tiabendazol de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. recolectados en Michoacán, Morelos, edo. de México, Puebla, Nayarit y Jalisco. ....	138
Cuadro 4. Sensibilidad al fungicida Propiconazol de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. recolectados en Michoacán, Morelos, edo. de México, Puebla, Nayarit y Jalisco. ....	140
Cuadro 5. Sensibilidad al fungicida Tebuconazol de aislados de <i>Colletotrichum</i> spp. colectados en Michoacán, Morelos, edo. de México, Puebla, Nayarit y Jalisco. ....	142

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Página

#### **Capítulo II.**

Anexo A. Caracterización multivariada de 300 aislados monospóricos de <i>Colletotrichum</i> obtenidos de frutos con antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México.....	66
---	----

#### **Capítulo III.**

Anexo B. Caracterización en terminos de patogenicidad y virulencia de 300 aislados monospóricos de <i>Colletotrichum</i> obtenidos de frutos con antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México. ....	93
---	----

#### **Capítulo IV.**

Anexo C. Caracterización en Molecular de 300 aislados monospóricos de <i>Colletotrichum</i> obtenidos de frutos con antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México. ....	118
--	-----

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR, PATOGENICIDAD CRUZADA  
Y RESISTENCIA A PRODUCTOS QUÍMICOS EN AISLADOS DE *Colletotrichum* spp.  
OBTENIDOS DE FRUTOS DE AGUACATE A NIVEL NACIONAL**

**Leticia Robles Yerena, D.C.**

**Colegio de Postgraduados, 2015**

**RESUMEN**

El cultivo del aguacate se ha constituido en una de las cadenas agroalimentarias de mayor importancia en México. Michoacán se ha mantenido como el principal productor y exportador del aguacate en el mundo, pero el rendimiento potencial de este cultivo aún no ha sido explotado al máximo debido a diferentes problemas fitosanitarios. La antracnosis del aguacate, causada por *Colletotrichum* spp. se presenta en todas etapas fenológicas del fruto, causando mayor problema durante pre y postcosecha con pérdidas entre un 20 a 50%. La antracnosis del aguacate en México es causada por *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*. En la presente investigación, se realizó la caracterización morfológica, patogénica y molecular de 300 aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de aguacate de las principales zonas productoras en México. Adicionalmente se realizaron pruebas de sensibilidad *in vitro* a fungicidas Tiabendazol, Propiconazol y Tebuconazol de los 30 aislamientos más patogénicos de la colección. En la caracterización morfológica *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* fueron identificados por la forma de los conidios y el análisis multivariado nos permitió suponer que existen más especies involucradas o se trata de un complejo de especies. Los 300 aislamientos fueron patógenos en aguacate. El 94% de los aislamientos puede afectar a mango y plátano en un fenómeno conocido como patogenicidad cruzada. En base a las secuencias moleculares se confirmó la presencia de

*Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), *C. acutatum* (*Glomerella acutata*) y *C. boninense*. Además y por primera vez se presenta evidencia molecular de la presencia de *Colletotrichum simmondsii*, *C. alienum*, *C. kahawae*, *C. aenigma*, *C. jasmini*, *C. fragariae*, *C. higginsianum*, *C. godetiae* y *C. tropicale* en el cultivo de aguacate en México. En la prueba de sensibilidad se obtuvo que los valores CE<sub>50</sub> en Thiabendazol variaron de 0.0713 a 1063 mg L<sup>-1</sup>; y los de CE<sub>95</sub> de 0.4583 a 7512 mg L<sup>-1</sup>. La mayor proporción de resistencia (PR) a nivel de CE<sub>95</sub> se observó en dos aislamientos del estado de Jalisco (JalTux276 y JalZapotil279) (>500 x), los valores CE<sub>50</sub> en Propiconazol variaron de 0.0173 a 1.4248 mg L<sup>-1</sup>; y los de CE<sub>95</sub> de 0.1350 a 91.085 mg L<sup>-1</sup>. Los valores más altos de PR a nivel de CE<sub>95</sub> se observó en los aislamientos MichArio11, Almola156, MorOcui57, MorYecapix81 y NayTepic125 (> 20x) y Los valores para CE<sub>50</sub> en Tebuconazol variaron de 0.0522 a 8.0719 mg L<sup>-1</sup> y los de CE<sub>95</sub> de 4.4531 a 1034 mg L<sup>-1</sup>. La PR a nivel CE<sub>95</sub> entre el aislamiento sensible y los más tolerantes fue de 34.419 a 43.796x, correspondiente a los aislamientos PueZacapal209 y MichUru5.

**Palabras clave:** *Persea americana*, *Colletotrichum*, ITS, fungicidas, control.

**MORPHOLOGICAL, MOLECULAR, PATHOGENICITY CROSS AND RESISTANCE  
TO CHEMICALS IN ISOLATED *Colletotrichum* spp. OBTAINED FROM AVOCADO  
FRUITS NATIONWIDE**

**Leticia Robles Yerena, D.Sc.**

**Colegio de Postgraduados, 2015**

**ABSTRACT**

Avocado cultivation has become one of the major food chains in Mexico. Michoacán has remained as the main producer and exporter of avocado in the world, but the potential yield of this crop has not yet been fully exploited due to different phytosanitary problems. Avocado anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. It comes in all phenological stages of the fruit, causing more problems during pre- and postharvest losses between 20-50%. Avocado anthracnose in Mexico is caused by *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *C. boninense*. In this research, morphological, pathogenic and molecular characterization of 300 isolates of *Colletotrichum* spp was carried out. Avocado fruits obtained from major producing areas in Mexico. Additionally, 30 of the most pathogenic isolates were test in vitro for sensitivity to fungicides thiabendazole, propiconazole and tebuconazole. In the morphological characterization *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* were identified by the shape of conidia. Multivariate analysis allowed us assume that there are more species involved or is a species complex. The 300 isolates were pathogenic in avocado. Ninety-four percent of the isolates can affect mango and banana in a phenomenon known as cross pathogenicity. Based on the presence of molecular characteristics *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), *C. acutatum* (*Glomerella acutata*) and *C. boninense* were confirmed attacking avocado. For the first time it is presented molecular evidence of the presence of

*Colletotrichum simmondsii*, *C. alienum*, *C. kahawae*, *C. aenigma*, *C. jasmini*, *C. fragariae*, *C. higginsianum*, *C. godetiae* and *C. tropicale* on avocado in Mexico. In the sensitivity test, it was obtained that Thiabendazole EC<sub>50</sub> values ranged from 0.0713 to 1063 mg L<sup>-1</sup>; and those of CE<sub>95</sub> of 0.4583 to 7512 mg L<sup>-1</sup>. The largest proportion of resistance (PR) CE<sub>95</sub> level was observed in two isolates of Jalisco (JalTux276 and JalZapotil279) (> 500 x), propiconazole EC<sub>50</sub> values ranged from 0.0173 to 1.4248 mg L<sup>-1</sup>; and those of CE<sub>95</sub> of 0.1350 to 91,085 mg L<sup>-1</sup>. Higher values of PR CE<sub>95</sub> level was observed in MichArio11, AlmolA156, MorOcui57, MorYecapix81 and NayTepic125 (> 20x) isolates and EC<sub>50</sub> values for Tebuconazole ranged from 0.0522 to 8.0719 mg L<sup>-1</sup> and 4.4531 of CE<sub>95</sub> to 1034 mg L<sup>-1</sup>. CE<sub>95</sub> the PR level insulation between sensing and 34,419 was more tolerant to 43.796 x, and corresponding to MichUru5 PueZacapal209 isolates.

**Key words:** *Persea americana*, *Colletotrichum*, ITS, fungicides control.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate es un árbol originario de Mesoamérica, su origen tuvo lugar en la parte centro de México y en algunas partes altas de Guatemala, donde ya se cultivaba con anterioridad a la llegada de los españoles. El nombre del aguacate proviene del náhuatl (Ahuacatl), palabra que significa “testículos del árbol”. Su nombre científico es *Persea americana* y proviene de la familia laurácea. Las exportaciones mexicanas de aguacate están concentradas principalmente en 3 mercados (EE.UU., Japón y Canadá). El comportamiento de las exportaciones es dinámico y creciente., pero uno de los problemas de pre cosecha y post cosecha mas limitante en los cultivos es el hongo *Colletotrichum* spp, estado anamorfo de *Glomerella* spp. *Colletotrichum* es un hongo Ascomyceto y principal agente causal de la enfermedad conocida como antracnosis (Damm *et al.* 2012; Noireung *et al.* 2012; Kumar, 2014). El genero *Colletotrichum* fue establecido por Corda (1831), como un hongo que se caracteriza por presentar conidias hialinas, vuvradas y fusiformes y un acérvulo setoso. El genero *Colletotrichum* presenta un numero diverso de especies que incluyen los patógenos y los saprofitos. Las especies de este género son consideradas como las más exitosas dentro de los hongos patógenos de plantas y se presentan tanto en zonas templadas como tropicales. Este hongo puede afectar gran parte de los tejidos, órganos de la planta y frutos. Su capacidad para causar infecciones latentes o quiescentes lo ubican dentro de los patógenos de postcosecha más importantes (Jeffries *et al.*, 1990). La tasa de crecimietno y las relaciones de temperatura han sido usados para diferenciar entre *C.gloeosporioides* y *C. acutatum*. Varios reportes sugieren que los aislamientos de *C. acutatum* crecen a una tasa significativamente menor que la de *C. gloeosporioides*, lo cual podría explicar la diferencia entre las tasas de crecimiento entre este grupo de aislamientos (Bernstein *et al.* 1995; Smith y Black, 1990). Freeman *et al.* (2000) mencionan que *Colletotrichum* presenta una gran variabilidad, la cual se expresa en



diferenciales de patogenicidad y virulencia. Según Jonsthorpe (2000), en la interacción variedad/patógeno, no se conoce con claridad porque una especie ataca a un huésped y no a otro. Por otro lado Alahakoon *et al.* (1994), Freeman y Shabi (1996) aseguran que los aislados de *C. gloeosporioides* son más virulentos en su sede de origen. Actualmente se ha observado que la morfología, morfometría y características culturales no puede identificar de forma inequívoca un aislado, por lo que se hace imprescindible el uso de herramientas moleculares que complementen esta identificación. Las regiones del espacio transcrito interno del ADN ribosomal o “Internal Transcribed Spacer” (ITS) ha sido ampliamente usadas para la delimitación de taxones (Dauch *et al.* 2003) y diferenciación entre especies y subespecies de *Colletotrichum* spp. Orberá (2004) menciona que estas zonas ofrecen fragmentos de distinto tamaño que permite la diferenciación de especies. Por otro lado, para su control los fungicidas más utilizados pertenecen al grupo de los Benzimidazoles (Benomilo, Thibendazol y Carbendazim). Desafortunadamente, debido al empleo indiscriminado de estos productos se ha reportado resistencia de *Colletotrichum* a los Benzimidazoles (FRAC, 2014), es por ello que en esta investigación se propuso conocer más al patógeno, evaluando su morfología, patogenicidad, su genoma para determinar de que especie se trata y la posible existencia de aislados de *Colletotrichum* spp. con resistencia a fungicidas.

## **Objetivos generales**

Determinar las especies presentes de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del aguacate en los principales estados productores a nivel nacional mediante caracterización morfológica, patogénica y molecular.

Determinar la sensibilidad de los aislados más patogénicos obtenidos de frutos de aguacate a los fungicidas tiabendazol, propiconazol y tebuconazol.

## **Objetivos específicos**

Establecer las especies presentes de *Colletotrichum* obtenidos de frutos de aguacate, mediante características morfológicas, culturales y morfométricas de cultivos monospóricos aislados de los principales estados productores de aguacate en México.

Determinar si aislados de *Colletotrichum* spp., varían en virulencia sobre frutos de aguacate cv Hass y si son variables en patogenicidad de diferentes hospederos.

Determinar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del aguacate mediante técnicas moleculares y la secuenciación del genoma por ITS.

Estimar los valores de sensibilidad de los aislados más patogénicos obtenidos de frutos de aguacate a los fungicidas tiabendazol, propiconazol y tebuconazol y determinar si los aislados presentan resistencia a los productos mencionados.

## Capítulo I. Patosistema *Persea-Colletotrichum*

Leticia Robles-Yerena<sup>1</sup>, Daniel Nieto-Ángel<sup>1</sup>, Daniel Téliz-Ortiz<sup>1</sup>, J. Concepción Rodríguez Maciel<sup>2</sup>, Dr. Mario Orozco Santos<sup>3</sup>, Cristian Nava-Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230. <sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad-Entomología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230 <sup>3</sup>INIFAP – Campo Experimental Tecoman. Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecoman, Colima, México: 28930. [lrobles@colpos.mx](mailto:lrobles@colpos.mx)

### 1.1 El género *Persea*

El centro de origen del aguacate (*Persea americana* Mill.) está ubicado entre México (partes altas del centro y este) y Guatemala. El centro de domesticación de este cultivo se considera México pues la evidencia más antigua del consumo de esta fruta fue encontrada en una cueva en Coxcatlán, Puebla y data de 10,000 años antes de Cristo (a.C.). En nuestro país, existen evidencias de frutos de *Persea* que fueron cultivados hace más de 500 a.C., mientras que en Perú se han encontrado que semillas de aguacate enterradas con momias Incas que datan de 750 a.C. (Téliz y Mora, 2007).

En el código Mendocino, que relata parte de la historia prehispánica de México, existen jeroglíficos donde se indica el poblado Ahuacatlan como el “lugar donde abunda el aguacate”. En el código Florentino ya se mencionan tres tipos de aguacate: aoacaquauitl, tlacacoloacatl y

quilaoacatl. Estos tipos posiblemente correspondan a las tres razas que conocemos en la actualidad (Téliz y Mora, 2007).

En México existen muchas poblaciones que hacen referencia a esta fruta. Por ejemplo, Ahuacatenango, Chiapas; Ahuacatepec, Veracruz; Aguacatitlán, Guerrero, Jalisco y estado de México. Después de la conquista, la “cupanda” (nombre purépecha del árbol de aguacate), fue introducida a España en 1600 y de ahí se diseminó a todo el mundo con las condiciones ambientales propicias para su desarrollo, llegando a Cuba en 1700, a Brasil en 1809, a África en 1870, a la India en 1892, a Nueva Zelanda en 1910, y a la región que hoy ocupa Israel en 1931. En la actualidad, este frutal se encuentra presente en los cinco continentes del planeta. A finales del siglo XIX y a principios del XX el consumo de aguacate estuvo basado en la producción de plantas de las razas mexicanas y antillana (Téliz y Mora, 2007).

El aguacate pertenece al género *Persea*, el cual es ubicado como el grupo más importante, desde el punto de vista económico, dentro de la familia Lauraceae (Pérez, 2008). El género *Persea* contiene alrededor de 85 especies, de las cuales 50 son originarias de América (Téliz y Mora, 2007). Una de estas especies es *P. americana* Mill, la cual se divide en tres razas: Mexicana, Antillana y Guatemalteca. Las razas Mexicana y Guatemalteca se originaron en las tierras altas de México y Guatemala, respectivamente; la raza Antillana probablemente tuvo su origen en la costa del Pacífico de Centroamérica desde Guatemala hasta Costa Rica (Téliz y Mora, 2007).

El área geográfica para el cultivo del aguacate se encuentra bastante extendida y comprende entre los 32 ° de latitud norte y los 36 ° de latitud sur, llega a regiones de Norteamérica como California y Florida, y de Sudamérica como Argentina y Chile (Téliz y Mora,

2007).

El cultivo del aguacate se ha constituido en una de las cadenas agroalimentarias de mayor importancia en México (Coria, 2009). En el ámbito mundial, nuestro país se ubicó en 2011, como el principal exportador de aguacate y en 2012, como líder en producción con un valor de 1,316,104 ton (FAOSTAT, 2014). En este mismo año se destinaron en México, 151,022.65 ha para su cultivo con un rendimiento promedio de 10 ton ha<sup>-1</sup> y un valor de producción superior a \$ 16,000,000 pesos. Los principales estados productores fueron Michoacán, el cual representó el 74.61% de la superficie nacional sembrada, seguido por Jalisco, Morelos, Nayarit, México, Guerrero y Puebla (SIAP, 2014). Las condiciones ambientales que prevalecen en estos estados propician el desarrollo del árbol y la obtención de fruto durante todo el año (Téliz y Mora, 2007).

La productividad del cultivo en esta amplia gama de ambientes, depende de un conjunto de factores ligados con las características agroambientales de los huertos. La baja fertilidad natural de los suelos, derivados de cenizas volcánicas, en los cuales se desarrolla más del 85% de los huertos de aguacate, se compensa con el uso constante y sistemático de fertilizantes químicos y orgánicos, los cuales proveen los nutrimentos esenciales para el frutal. Sin embargo, factores de clima como heladas, granizo, precipitaciones, temperatura, humedad relativa y vientos fuertes, así como la presencia de plagas como trips (*Frankliniella* spp., *Heliethrips haemorrhoidalis* Bouché, *Scirtothrips* spp., *Pseudophlothrips perseae* Watson), araña roja (*Oligonychus punicae* Hirst), y enfermedades como roña (*Sphaceloma persea* Jenk) y antracnosis (*Colletrotrichum* spp.), son los principales factores que limitan la producción de este frutal (Téliz y Mora, 2007).

## 1.2 El género *Colletotrichum*

### 1.2.1 Importancia

*Colletotrichum* es un hongo Ascomyceto y principal agente causal de la enfermedad conocida como antracnosis (Damm *et al.* 2012; Noireung *et al.* 2012; Kumar, 2014). Este género que se encuentra distribuido en zonas de clima tropical, subtropical y templado (Yang *et al.* 2012; Weir *et al.* 2012). Este hongo ocasiona daños en al menos 470 géneros de hospederos (Cannon *et al.* 2008) entre los que se encuentran numerosas especies de importancia económica (Peres *et al.* 2005; Damm *et al.* 2012; Noireung *et al.* 2012; Kumar, 2014). *Colletotrichum* ocasiona importantes pérdidas económicas en pre y postcosecha, afectando la cantidad y calidad del producto cosechado (Latunde-Dada, 2001; Peres *et al.* 2005). Este hongo tiene la habilidad de causar infecciones latentes o quiescentes en frutos en desarrollo y la enfermedad se manifiesta una vez que estos llegan a madurez (Prusky y Dickman, 2000; Yakoby *et al.* 2001), por lo que *Colletotrichum* es catalogado como uno de los patógenos más importantes en postcosecha (Abang *et al.* 2002; Stanley *et al.* 1998) y esta catalogado como uno de los diez hongos fitopatógenos más relevantes a nivel mundial (Dean *et al.* 2012).

En México, *Colletotrichum* ocasiona importantes pérdidas en el cultivo de aguacatero pues se reporta en el 80-90% de la superficie cultivada donde se presenta año con año en las huertas. Puede afectar la floración y amarre o cuajado de fruto, daña los frutos en maduración, ramas tiernas y cuando las hojas son afectadas se disminuye la capacidad fotosintética del árbol (Vidales-Fernández, 2002). Afecta frutos cuando se encuentran en el árbol, así como durante el traslado, almacén y comercialización, constituyendo uno de los factores que más limitan la disponibilidad

de fruta para exportación. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad son cercanas al 20% de la producción (Vidales-Fernández, 2002; Rodríguez-López, 2009), pero se han reportados daños en el estado de Michoacán de hasta un 74% (en precosecha) y 100% (en postcosecha) (Téliz, 2000).

En mango, *Colletotrichum* es de gran importancia pues puede afectar hasta el 80% de los frutos en amarre inicial (8-15 mm de diámetro) cuando no se utiliza control químico (Arauz, 2000). Durante el desarrollo del fruto las pérdidas pueden ser del 50 a 100% con alta humedad ambiental y sin manejo de la enfermedad. Sin embargo, los principales daños de *Colletotrichum* en mango ocurren en postcosecha ya que limita la vida útil y la exportación de fruta fresca (Charles *et al.* 2012) y ocasiona pérdidas entre 15 y 50% (Rojas *et al.* 2008).

### **1.2.2 Rango de hospederos**

Entre los principales hospederos de *Colletotrichum* spp. se encuentran las solanáceas (tabaco, chile, papa) (Nitzan *et al.* 2010; Than *et al.* 2008), leguminosas (alfalfa, chícharo, soya, frijol, haba) (Bhadoria *et al.* 2013; Rodríguez-Guerra *et al.* 2006), gramíneas (sorgo, avena, caña de azúcar, maíz, pastos) (Anne y Tomaso, 2012; Cannon *et al.* 2012; Costa da *et al.* 2005; Leyva-Mir *et al.* 2004; Singh 2008), orquídeas (Chowdappa *et al.* 2012), malváceas (algodón, kenaf, okra, café) (Bailey *et al.* 1996; Chen y Rodríguez, 2005) y diversas familias de frutales (Agostini *et al.* 1992; Sreenivasaprasad *et al.* 1992) como Lauráceas (aguacate) (Montero *et al.* 2010; Barquero *et al.* 2013), Anacardiáceas (mango) (Dodd *et al.* 1992), Musáceas (plátano) (Peres *et al.* 2002), Caricáceas (papaya) (Dodd *et al.* 1992), Rutáceas (limón, naranja, lima) (Agostini *et al.* 1992; Brown *et al.* 1996), Rosáceas (fresa, durazno, almendro, manzana) (Adaskaveg y Hartin, 1997; Crusius *et al.* 2002; Sreenivasaprasad *et al.* 1992), Mirtáceas (guayaba) (Gutiérrez-Alonso *et*

*al.* 2002), Anonáceas (guanábana, chirimoya) (McMillan, 1986), Rubiáceas (café) (Cannon *et al.* 2012; Chen *et al.* 2006) y Oleáceas (olivo) (Talhnhinas *et al.* 2005).

Un hospedante puede ser parasitado por múltiples especies de *Colletotrichum* y múltiples hospedantes pueden ser infectados por una sola especie de este patógeno (Phoulivong *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012). Infecciones combinadas se han observado en fresa (Ureña-Padilla *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2004), olivo (Talhnhinas *et al.* 2005), plantas forrajeras (*Stylosanthes* spp.) (Munaut *et al.* 2002) y camote (*Dioscorea* spp.) (Abang *et al.* 2002). Las especies más agresivas a nivel mundial incluyen a *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., *C. acutatum* Simmonds., *C. coccodes* (Wallr.) Hughes, y *C. kahawae* (Waller y Bridge) (Waller *et al.* 1993).

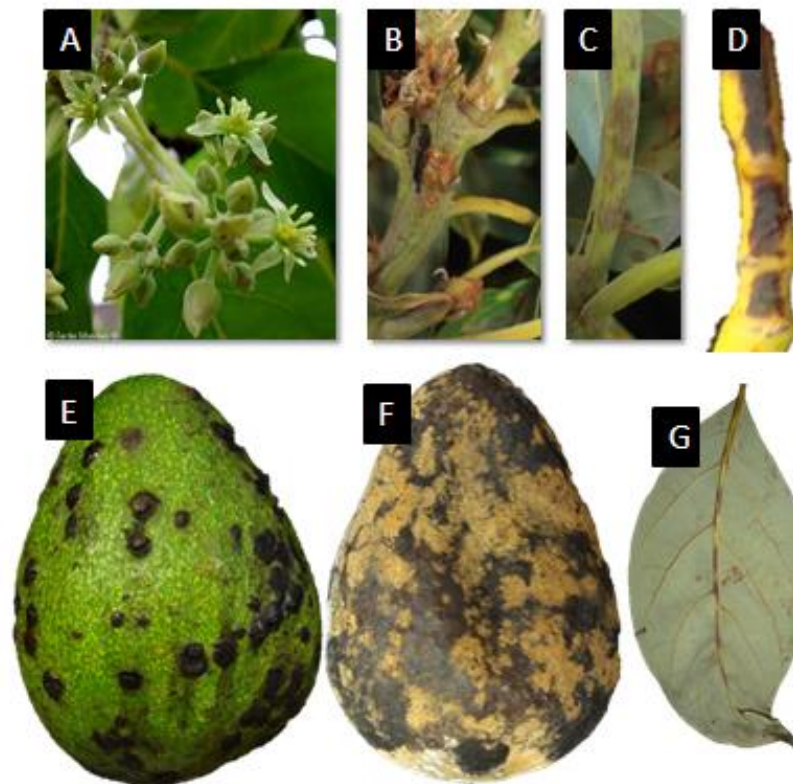
### **1.2.3 Síntomas**

En el caso de *Colletotricum* la infección se ve favorecida por lluvia abundante, alta humedad relativa (mas del 80%) y temperatura entre 24 y 28°C (Dodd *et al.* 1992). El pH que favorece el crecimiento de este hongo es de 5.5 a 7.0 (Prusky *et al.* 2001; Drori *et al.* 2003).

El patógeno afecta hojas, ramas, inflorescencias y frutos (Swamy, 2012), ocasionando diferentes síntomas que pueden interactuar durante el ciclo de cultivo (Orozco-Santos *et al.* 2006; Yakoby *et al.* 2001; Agrios, 2005). También se ha reportado que este hongo infecta raíces, tubérculos y puede ser catalogado como saprófito (Latunde-Dada 2001) e incluso se ha relacionado como causante de enfermedades en humanos (Cano *et al.* 2004).



Cuando ataca frutos, puede ocasionar antracnosis en frutos en desarrollo (pre cosecha) y frutos maduros durante el almacenamiento (post cosecha) (Orozco-Santos, 2006). Cuando ataca frutos recién formados y se presentan condiciones ambientales favorables la enfermedad, el hongo ocasiona pérdidas totales debido al aborto y falta de amarre (Agrios, 2005; Freeman *et al.* 1995). Cuando ataca frutos en desarrollo se observa la típica antracnosis que se caracteriza por presentar lesiones suaves, hundidas, de aspecto húmedo, de color rojo oscuro a negro (Waller *et al.* 2002; Kumar, 2014) (Figura 1). Conforme los frutos maduran, se observa pudrición de la pulpa o mesocarpo (Prusky *et al.* 2001; Agrios, 2005). En el momento de la maduración, las condiciones del hospedante favorecen el desarrollo y propagación del hongo, dando origen a epifitas destructivas (Agrios, 2005).



**Figura 1.** Síntomas y signos de Antracnosis (*Colletotrichum* spp.) en tejido y frutos de aguacate. A) en flores, B) en brotes, C-D) en tallos, E-F) en frutos con esporulación color salmón y en G) la nervadura de las hojas

De acuerdo con lo documentado por Cuiris-Pérez *et al.* (2009), la antracnosis del aguacate se manifiesta sobre diferentes partes de la planta. En las hojas aparecen pequeñas manchas de color café claro las cuales aparentan ser más grandes cuando llegan a juntarse. En brotes tiernos se observan abultamientos alrededor del brote con presencia de savia color blanco, a este síntoma se le conoce como “sarampión” y pueden llegar a secar las partes afectadas, que generalmente son las puntas de las ramas, lo cual es conocido como “marchitez de las puntas”. En las inflorescencias se presenta atizonamiento, originando la caída de flores y aborto de frutos. En los frutos se presentan pequeñas protuberancias de color verde brillante, las cuales se desarrollan en cualquier etapa del fruto, el ataque es más severo cuando el fruto es pequeño; las lesiones son circulares y posteriormente cambian de color café a negro claro y consistencia corchosa, lo cual es conocido como “viruela” o “clavo”. Prusky (1996) menciona que los frutos en precosecha presentan dos tipos de síntomas: uno consiste en lesiones pequeñas localizadas alrededor de la lenticelas sobre la cáscara que reducen la calidad y provocan su caída. El otro consiste de grandes áreas dañadas en forma dispersa sobre la cáscara del fruto que resultan de la infección a través de la alimentación de insectos o daños mecánicos. En frutos en postcosecha, la enfermedad se manifiesta con la presencia de manchas circulares, café oscuras en el pericarpio, daños por ablandamiento y pudrición de la pulpa o mesocarpo (Yakoby *et al.* 2001; Prusky *et al.* 2001). El daño se expande de una forma hemisférica de la pulpa del fruto hacia las semillas (Prusky, 1996). Por lo general, en el centro de las lesiones se presenta una masa viscosa de esporas del patógeno de coloración rosada (Nelson, 2008).

En mango, las lesiones por *C. gloeosporioides* se desarrollan principalmente en tejidos jóvenes como inflorescencias, hojas, tallos y frutos. En las hojas aparecen pequeñas manchas de color café oscuro, las cuales forman lesiones irregulares de aproximadamente un centímetro de

diámetro (Ploetz, 1994). En inflorescencias los síntomas se manifiestan como lesiones oscuras, que aumentan y se fusionan. En ataques severos el patógeno puede causar aborto de flores. En frutos verdes aparecen pequeñas manchas de color café, las cuales permanecen latentes hasta después de la cosecha, siendo el daño más importante en postcosecha. Al inicio de la maduración, se observan lesiones irregulares de color café oscuro a negro, pudiéndose formar en cualquier parte de la superficie, o bien formando como un lagrimeo característico que se extiende del pedicelo hacia la parte inferior de los frutos. Cuando las lesiones cubren la totalidad de la superficie del fruto, se desarrollan hasta 5 mm hacia el interior de la pulpa, y dan origen a masas de esporas de color naranja a rosado (Kumar, 2014).

La antracnosis del plátano comienza con infecciones quiescentes sobre frutos verdes en el campo. Los síntomas generalmente son visibles en frutas maduras (Lim *et al.* 2002). La severidad es mayor cuando la fruta sufre lesiones durante el manejo y transporte (Wardlaw, 1934). Los síntomas incluyen lesiones negras o marrones y hundidas, las cuales pueden estar cubiertas de masas de conidios color salmón. Las infecciones, la estimulación, la maduración de los frutos y las lesiones se presentan como manchas marrón, alargadas, hundidas y con acérvulos color naranja (Lim *et al.* 2002; Ranasinghe *et al.* 2005).

#### **1.2.4 Clasificación taxonómica**

El género *Colletotrichum* fue establecido por Corda en 1831 para referirse a hongos caracterizados por conidios hialinos, de fusiformes a curvos y acérvulos con setas (Sutton, 1992). La identificación de especies de *Colletotrichum* se ha basado en diferencias morfológicas y culturales, tales como color de colonia, tipo de micelio, tamaño y forma de los conidios,

apresorios, desarrollo de peritecios con ascas, ascosporas y presencia o ausencia de setas (Freeman *et al.* 1998; Lardner *et al.* 1999; Sutton, 1992). El rango de hospedantes también ha sido útil en la identificación (Wharton y Diéguez, 2004). Por ejemplo, es posible diferenciar a *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. coccodes*, *C. trifolii*, *C. dematitium*, *G. cingulata* y *Gloeosporium* spp. en base en la virulencia de cada aislamiento. Desafortunadamente el ambiente provoca una considerable variación patogénica y morfológica en el hongo y estos criterios por sí solos no siempre son adecuados para la diferenciación confiable de las especies (Álvarez, 2014; Freeman *et al.* 1998). La identificación utilizando múltiples variables es la más recomendada, por ejemplo Smith y Black (1990) caracterizaron morfológica, cultural y patogénicamente las especies de *Colletotrichum* aisladas de fresa (*C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*).

La clasificación de este género se encuentran en constante cambio. En la actualidad el género *Colletotrichum* constituye un desafío para los taxónomos dado el concepto de especie para este hongo no ha sido bien definido o universalmente aceptado (Wharton y Diéguez, 2004). La clasificación taxonómica más reciente y aceptada a nivel mundial es la siguiente (Catalogue of life, 2014):

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: No asignado

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Los estudios taxonómicos en *Colletotrichum* se han centrado principalmente en la identificación de las especies y en la caracterización de las subpoblaciones dentro de cada especie (Freeman *et al.* 1998; Martínez *et al.* 2009). La diferenciación entre las especies de *Colletotrichum* responsables de enfermedades es de vital importancia para el desarrollo de estrategias y aplicación de controles efectivos (Freeman *et al.* 1998; Photita *et al.* 2005).

### **1.2.5 Características**

El género *Colletotrichum* presenta un micelio entrelazado, con hifas septadas, de hialinas o color castaño pálido del cual se producen conidióforos septados, ramificados sobre la base, de color café claro. Los conidios son unicelulares fusiformes o cilíndricos, hialinos a café pálido, de tamaño variable (7–20 x 2.5–5 µm), a veces con apice obtuso. Los apresorios son de 6-20 x 4-12 µm. En el hospedante el hongo forma acérvulos de hasta 500 µm de diámetro que pueden o no tener setas (Barnett y Hunter, 1998; Blanchard *et al.* 1992; Cano *et al.* 2004; Dean *et al.* 2012; Holliday, 1995; Roca *et al.* 2005). Las esporas se producen en tales cantidades que llegan a formar masas mucilaginosas de color rosado o salmón (Blanchard *et al.* 1992; Holliday, 1995). Algunas especies de este género se caracterizan por formar peritecios, que son la fase sexual del hongo, cuando se desarrollan en medio de cultivo. La mayoría de las especies presentan ascosporas curvas y estrechas en los extremos (Weir *et al.* 2012).

### **1.2.6 Identificación molecular**

Los factores ambientales influyen sobre la estabilidad de los rasgos morfológicos y la presencia de formas intermedias, por lo que los criterios morfológicos no son siempre los adecuados para

ofrecer confiabilidad en la identificación de las especies de *Colletotrichum* (Freeman *et al.* 1998; Afanador-Kafuri *et al.* 2003). En los últimos años se han incorporado análisis filogenéticos de regiones ribosomales (ej. ITS, 28S, etc.) y funcionales (ej. actina, calmodulina,  $\beta$ -tubulina, etc) como aspectos fundamentales para la identificación de especies dentro de este género (Cai *et al.* 2009; Hyde *et al.* 2009). A partir de filogenias de múltiples genes se ha encontrado que especies como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. corresponden a un complejo de especies polimórficas que contiene una serie de subgrupos con diferentes grados de patogenicidad, especificidad y diversidad genética, por lo cual resulta muy difícil su identificación utilizando sólo criterios morfológicos (Cai *et al.* 2009; Hyde *et al.* 2009; Meizhu *et al.* 2005).

El uso de las herramientas moleculares en conjunto con las características morfológicas y culturales son una alternativa para minimizar los posibles errores en la identificación de las especies de *Colletotrichum* (Lima *et al.* 2013; Liu *et al.* 2013; Weir *et al.* 2012). Las herramientas moleculares han sido útiles para determinar la complejidad genética de *Colletotrichum* spp. que infectan frutos tropicales y subtropicales (Braithwaite y Manners, 1989). Por ejemplo, Sreenivasaprasad *et al.* (1992) determinaron molecularmente a *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* como responsables de la antracnosis en fresa. Estudios similares se han realizado para determinar diferencias entre aislados de *C. gloeosporioides* causantes de antracnosis en frutos de aguacate, mango y papaya (Mills *et al.* 1992). En aguacate, los estudios moleculares encontraron que la antracnosis es causada por *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* (Binyamini y Schiffmann, 1972; Montero *et al.* 2010; Barquero *et al.* 2013) y *C. boninense* (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011). Recientemente se ha encontrado que *C. alienum*, *C. aenigma*, *C. firiniae*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. queenslandicum*, *C. simmondsii*, *C. siamense* y *C. tropicale* afectan raíces, hojas y frutos de aguacate (Hyde *et al.* 2009; Damm *et al.* 2012; Dórea 2013; Weir *et al.* 2012).

Respecto a la variabilidad de *Colletotrichum*, Masel *et al.* (1990) indicaron que en condiciones de campo, el genoma de las poblaciones de *C. gloeosporioides* es muy variable. Las causas de esta variación aun son descononidas. Morales (1996) logró separar aislados de *C. gloeosporioides* con base en diferentes sistemas isoenzimáticos, aunque no logró obtener buena resolución para ninguna deshidrogenasa. Lenné y Burdon (1990) encontraron seis patotipos de *C. gloeosporioides* asociados a diferentes patrones isoenzimáticos. Bailey y Jeger (1992) reportaron un estudio de variación genética en aislados de *C. gloeosporioides* obtenidos de aguacate, papaya, plátano y mango, confirmando que hay alta variación entre aislados del mismo cultivo y en el mismo país. Mills *et al.* (1992) reportaron alta diversidad en esta especie aislada de aguacate, mediante el empleo de patrones de restricción con las enzimas Hind III y Bam I e hibridizados con el plásmido pMY60 usado como sonda. Sreenivasaprasad *et al.* (1992) utilizaron RFLP en DNA ribosómico y mitocondrial de *C. gloeosporioides* aislados de fresa y encontraron que no había variación entre aislados. Es por ello que *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* no deben ser considerados como una especie sino como un grupo de especies.

En la actualidad, se reconocen 28 especies ubicadas dentro del género *Colletotrichum* (Peng *et al.* 2013; Weir *et al.* 2012). Una de las especies mas importantes, *C. acutatum*, agrupa 4 diferentes sub especies, incluyendo la original descrita por Simmonds en 1965 (Wharton y Diéguez, 2004). De igual manera, esta especie contiene varios taxa con características morfológicas similares que comprenden endófitos, saprófitos y hongos patógenos de plantas (Photita *et al.* 2005). *Colletotrichum gloeosporioides* fue definida por Weir *et al.* (2012) como un complejo de especies que abarca un clado definido. Todos los taxas aceptados dentro de este clado son morfológicamente similares e incluyen 23 especies: *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. horii*, *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C.*

*psidii*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, *C. xanthorrhoeae*, *C. aenigma*, *C. aeschynomenes*, *C. alatae*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. clidemiae*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. salsolae*, *C. ti* y *C. queenslandicum* (por *C. gloeosporioides* var. *minus*.). Todas ellas se definen genéticamente sobre la base de las filogenias de múltiples genes. Cada clado contiene varias especies que están filogenéticamente bien apoyados en los análisis de múltiples genes. Dentro de los clados existen ramas de cortas longitudes debido al pequeño número de caracteres filogenéticamente informativos. Los genes como deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato y glutamina sintetasa han mostrado ser útiles para distinguir confiablemente la mayoría de los taxones, los cuales tendrán que ser desarrollados como códigos de barras secundarias para la identificación a nivel de especie (Weir *et al.* 2012).

### **1.2.7 Patogénesis**

El proceso de infección de *Colletotrichum* spp. involucra una secuencia de eventos, entre los que se pueden mencionar: 1) el arribo del conidio a la superficie de la planta, 2) adhesión del conidio a esta superficie, 3) germinación del conidio, 4) producción de un apresorio, 5) penetración de la epidermis de la planta, 6) crecimiento y colonización de los tejidos de la planta y 7) producción de acérvulos y esporulación (Bergstrom y Nicholson, 1999; Prusky *et al.* 2001).

Los conidios formados dentro de un acérvulo son la fuente principal de diseminación y de inóculo del patógeno. Los conidios se encuentran encapsulados en una sustancia mucilaginosa soluble en agua que es esencial para asegurar su supervivencia y diseminación (Bergstrom y Nicholson, 1999). Este mucilago está compuesto de polisacáridos, glucoproteínas, inhibidores de la germinación y enzimas. Las principales funciones del mucilago son como adherente, protector



contra la desecación, temperaturas extremas, rayos ultravioleta y metabolitos tóxicos de la planta (Lax *et al.* 1985).

La dispersión de los conidios de *Colletotrichum* spp. puede ser por aire o salpicaduras de lluvia (Jeffries *et al.* 1990; Téliz y Mora, 2007). Los conidios se adhieren rápidamente a la cutícula del tejido vegetal debido a la capa mucilaginosa (Téliz y Mora, 2007). Una vez que los conidios tienen contacto con la superficie hidrofóbica foliar, liberan un material para adherirse fuertemente a la cutícula (Mercure *et al.* 1994). De acuerdo con O'Connell *et al.* (1996) las manoproteínas son las responsables de la hidrofobicidad en la superficie celular y controlan la adhesión de las esporas de *C. lindemuthianum* y *C. gloeosporioides* sobre el hospedero. *C. trifolii* contiene enzimas cutinasas y esterases que le ayudan en la adhesión y penetración (Dickman *et al.* 2003).

Cuando los conidios perciben señales de la superficie de la planta, se activa su germinación con la emisión de un tubo germinativo de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud. Este fenómeno ocurre en un periodo de 12 a 48 h (Perfect *et al.* 1999). En las asociaciones de *C. gloeosporioides* y *C. musae* en aguacate y banano, respectivamente, la germinación del conidio y formación del apresorio es inducida por el incremento en la producción de etileno y las cera epiculares del hospedante (Kim *et al.* 2000).

La formación del apresorio es una característica del género *Colletotrichum*, esta estructura es esencial para que ocurra la infección (Bailey *et al.* 1992; Jeffries *et al.* 1990; Latunde-Dada, 2001). Sin embargo, existen especies dentro de este mismo género que no requieren la formación del apresorio para la penetración del hospedante (Zulfiqar *et al.* 1996). El apresorio comienza a diferenciarse cuando el crecimiento del tubo germinativo se detiene, y su punta se abulta y

delimita por un septo. Su maduración involucra la formación de un poro de penetración en la base de la célula, la deposición de nuevas capas de la pared y la secreción de materiales mucilaginosos, así como el subsecuente depósito de melanina en la capa de la pared celular (Bailey *et al.* 1992). Los apresorios jóvenes son ligeramente pigmentados o hialinos y con el tiempo sus paredes son gruesas y pigmentadas (Jeffries *et al.* 1990). El apresorio maduro es una estructura asimétrica, polarizada, con un domo superior melanizado y una región basal plana que contiene un poro complejo (O'Connell *et al.* 1996; Prusky *et al.* 2000; Latunde-Dada, 2001).

Se han reportado que existen diferentes modos de penetración por parte de *Colletotrichum*: por aberturas naturales (estomas), herida o penetración directa, siendo esta última la forma más común (Bailey *et al.* 1996). La penetración del hospedante ocurre después de la formación del apresorio y una vez que este madura y es melanizado. Dentro del apresorio se crea una alta presión hidrostática que facilita la penetración. De acuerdo con lo documentado Bailey *et al.* (1992), existen tres mecanismos de penetración: 1) aquella basada en una fuerza mecánica, 2) en secreción de enzimas que degrada la cutícula y 3) una combinación de ambos procesos.

La penetración al fruto del aguacate inicia con la aparición de la hifa de penetración a través de un poro que se encuentra en la base del apresorio y se introduce a través de la cutícula de la pared celular de la planta (Yakoby *et al.* 2001). En *C. gloeosporioides*, la penetración de la hifa en la cutícula y células epidérmicas del hospedero involucra la fuerza mecánica a través de la alta presión hidrostática, así como la acción enzimática mediante la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular (Prusky *et al.* 2001; Weir *et al.* 2012). En *C. lindemuthianum*, la presión hidrostática se genera al incrementarse la concentración molar de glicerol, mismo que es retenido por la célula y es impermeable a la melanina. En algunas especies hemibiotróficas de

*Colletotrichum*, la penetración de las células epidérmicas ocurre mediante una hifa primaria larga dentro del lumen de la célula, sin perturbar el plasmalema o al protoplasto del hospedero. La fase asintomática de la antracnosis dura de las 48 a 72 h después de la inoculación, donde el plasmalema y el tonoplasto de las células infectadas continúan funcionales (Latunde-Dada, 2001).

Durante la colonización de plantas hospederas, *Colletotrichum* exhibe dos formas de nutrición: 1) biotrofia, en donde los nutrientes son obtenidos de células hospederas vivas y 2) necrotrofia, en la cual son adquiridos de células muertas invadidas por el patógeno. Estas formas de nutrición corresponden a la fase inicial o asintomática y a la fase destructiva visible (Bailey *et al.* 1992).

La colonización del hospedante por *Colletotrichum* puede ser intramural subcuticular e intracelular (Bailey *et al.* 1992). En la colonización intramural subcuticular, el micelio se desarrolla debajo de la cutícula mediante la formación de una red intramural de hifas, seguida de su diseminación a través del tejido con hifas inter e intracelulares que ocasionan la muerte del tejido (Bailey *et al.* 1992; Bergstrom y Nicholson, 1999). En la colonización intracelular ocurre la formación de una red de hifas dentro de las células del hospedante, siendo variable el tiempo del estado biotrófico (Bailey *et al.* 1992). Cuando los tejidos de las plantas han sido completamente colonizados, el patógeno cambia a un comportamiento necrotrófico (Bailey *et al.* 1992).

### **1.2.8 Control**

La producción de mango y otros frutales puede ser destruida por completo por *Colletotrichum* si no se controla a tiempo (Fitzell, 1979; Guillén *et al.* 2003). En general, los daños

son menores en regiones secas, pero en zonas tropicales es imprescindible utilizar tratamientos químicos desde inicio de floración hasta frutos con diámetro de 10 a 15 mm (Guillén, 2000). Para disminuir el número de aplicaciones es conveniente desarrollar modelos de predicción de la enfermedad basado en factores como temperatura y humedad foliar (Guillén, 2000). Los fungicidas más utilizados pertenecen al grupo de los Benzimidazoles (Benomilo, Thibendazol y Carbendazim). Desafortunadamente, debido al empleo indiscriminado de estos productos se ha reportado resistencia de *Colletotrichum* a los Benzimidazoles (FRAC, 2014, Gutiérrez y Gutiérrez, 2003). Otros grupos alternativos para el control de antracnosis son los Triazoles (Hexaconazol, Propiconazol, Triadimefon), Imidazoles (Prochloraz e Imizalil), Estrobilurinas (Azoxistrobin, Trifloxystrobin) y Protectantes (Clorotalonil, Mancozeb y Oxicloruro de cobre) que permiten utilizar rotación de productos para minimizar el riesgo de generar resistencia (Nieto *et al.* 2003).

Dentro de las medidas de control cultural que permiten disminuir la intensidad de la enfermedad en campo se incluyen: eliminación de hojas y frutos caídos para reducir fuentes de inóculo, podas de brotes vegetativos y erradicación de malezas. Para el control de la enfermedades en postcosecha se ha implementado la inmersión de frutos en agua caliente que contiene Imazalil o Prochloraz o la combinación de estos fungicidas (Acosta *et al.* 2003).

Para el manejo integrado de la antracnosis en aguacate las estrategias deben realizarse durante la fase productiva y durante la postcosecha (Pegg *et al.* 2007). Los fungicidas son el factor más importante para el manejo de la enfermedad pues si son aplicados a tiempo pueden prevenir la infección (Brent y Hollomon, 1998). En México, el control de la antracnosis se basa en el uso de fungicidas preventivos (Téliz y Mora, 2007) benzimidazoles (Vega, 1994; Becerra-Leor, 1995), estrobilurinas (Slawecki *et al.* 2002; Anesiadis *et al.* 2003; Miles *et al.* 2004).

### 1.3 Literatura citada

- Abang, M.M., Winter, S., Green, K.R., Hoffmann, P., Mignouna, H.D. and Wolf, G.A. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology* 51:63-71.
- Acosta, R.M., Noriega, C.D.H., Nieto, A.D. y Téliz, O.D. 2003. Efecto del manejo integrado del mango (*Mangifera indica* L.) en la incidencia de enfermedades y en la calidad de frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 46-55.
- Adaskaveg, J.E. and Hartin, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87: 979-987.
- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymom, M. and Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93: 579-587.
- Agostini, J.P., Timmer, L.W. and Mitchell, D.J. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82: 1377-1382.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edición. San Diego. Academic Press, USA.
- Álvarez, E. 2014. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *European Journal of Plant Pathology* 139: 325-338.
- Anesiadis, T., Karaoglanidis, R., and Klonari, K.T. 2003. Protective, curative and eradicant activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. *Journal of Phytopathology* 151: 647-651.
- Anne, C.J. and Tomaso, P.M. 2012. Anthracnose disease of centipedegrass turf caused by *Colletotrichum eremochloae*, a new fungal species closely related to *Colletotrichum*

- sublineola*. Mycologia 104: 1085-1096.
- Arauz, L.F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. Plant Disease 84: 600-611.
- Bailey, J.A. and Jeger, M.J. 1992. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. CAB International. Wallingford, U. K.: 388p.
- Bailey, J.A., Nash. C., Morgan, L.W., O'Connell, R.J. and TeBeest, D.O. 1996. Molecular Taxonomy of *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose on the Malvaceae. Molecular Plant Pathology 86: 1076-1083.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA: 218 p.
- Barquero, Q.M., Peres, A.N. y Arauz, L.F. 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho de hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida, Estados Unidos. Agronomía Costarricense 37: 23-38.
- Becerra-Leor, E.N. 1995. Enfermedades del cultivo de mango. pp.83-101. En: I. Mata- Beltran y R. Mosqueda-Vazquez (eds.). La producción de mango en México. Noriega Editores. Mexico, D.F.
- Bergstrom, G.C. and Nicholson, R.L. 1999. The biology of corn anthracnose-Knowledge to exploit for improved management. Plant Diseases 83: 596-608.
- Bhadauria, V., Bett, K.E., Zhou, T., Vandenberg, A., Wei, Y., and Banniza, S. 2013. Identification of *Lens culinaris* defense genes responsive to the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. BMS Genetics 14: 1-9.
- Binyamini, N. and Schiffmann. N.M. 1972. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology. 62: 592-294.

- Blanchard, G., Campbell, C. and Lucas, L. 1992. Introduction to plant diseases: identification and management. Kluwer Academic Publishers, Second Edition. Massachusetts, USA: 365.
- Braithwaite, K.S. y Manners, J.M. 1989. Human hypervariable minisatellite probes detect DNA polymorphisms in the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. Current Genetics 16: 473-475.
- Brent, K. J., and Hollomon, D.W. 1998. Fungicides resistance:How can it be managed? Global Crop Protection Federation. Global Crop Protection Federation and Fungicides Resistance Action Committee. Monograph No. 2. United Kingdom. 48p.
- Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L.W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange, and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. Phytopathology 86: 523-527.
- Cai L., Hyde K.D, Taylor P.W.J., Weir B.S., Waller J., Abang M.M., Zhang J.Z., Yang Y.L., Phoulivong S., Liu Z.Y., Prihastuti H., Shivas R.G., Mckenzie E.H.C., Johnston P.A.R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39:183-204.
- Cannon P.F., Damm U., Johnston P.R., Weir B.S. 2012. *Colletotrichum*: current status and future directions. Studies in Mycology 73: 181-213.
- Cannon, P.F., Buddie, A.G., Bridge, P.D. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. Mycotaxon 104:189–204.
- Cano, J., Guarro, J. and Gene, J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. Journal of Clinical Microbiology 42: 2450-2454.
- Catalogue of life 2014. Disponible en: [http:// www.catalogueoflife.org/col/browse/tree](http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree).

Revisado el 13 de diciembre de 2014.

- Charles, A.O., Samuel, O., Oworu, O.O. and Sosanya, O. 2012. First Report of Fruit Anthracnose in Mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Southwestern Nigeria. International Journal of Scientific & Technology Research 1: 30-34.
- Chen, L.S., Chu, C., Liu, C.D., Chen, R.S. and Tsay, J.G. 2006. PCR-based Detection and Differentiation of Anthracnose Pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from Vegetable Soybean in Taiwan. Journal of Phytopathology 154: 654-662.
- Chen, Z.L.J. and Rodriguez, C.J. 2005. *Colletotrichum gloeosporioides* can overgrow *Colletotrichum kahawae* on green coffee berries first inoculated with *C. kahawae*. Biotechnology Letters 27: 679-68.
- Chowdappa, P., Somashekar, Ch.Ch., Harghavi, R., Sandhya, H. and Prasad, P.R. 2012. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. isolates causing anthracnose of orchids in India. Biotechnology Bioinformatics Bioengineering. 2: 567-572.
- Coria A.V.M. 2009. Plagas. p. 93.116. En: Tecnología para la producción de aguacate em México. Segunda edición. Coria A.V.M. (Ed.). López Impresores S.A. de C.V.
- Costa da, R.V., Casela, C.R., Zambolim, L., Santos, G.F., Vale do, F.X.R. 2005. Evaluation of Genetic Mixtures of Sorghum Lines for Anthracnose Resistance Management. Fitopatologia Brasileira 30: 525-526.
- Crusius, L.U., Forcelini, C.A., Sanhueza, R.M.V. and Fernandes, J.M.C. 2002. Epidemiology of apple leaf spot. Fitopatologia Brasileira 27: 065-070.
- Cuiris-Pérez H., Guillén-Andrade H.E., Pedraza-Santos M., López-Medina J., and Vidales-Fernández I. 2009. Genetic variability within Mexican race avocado (*Persea*



- americana* Mill.) germplasm collections determined by ISSRs. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(2): 169-175.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., Weir, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G. and Crous P.W. 2012. The *Colletotrichum boninense* specie complex. *Studies in Mycology* 73: 1-36.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond–Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, D.P., Rudo, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. and Foster, D.G. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414-430.
- Dickman, M.B., Ha, Y.S., Adams, B. and Huang, C. 2003. A protein kinase from *Colletotrichum trifolii* is induced by plant cutin and is required for appressorium formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 411-421.
- Dodd, J.C., Estrada, A., Jeger, M.J. 1992. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates in the tropics. In: Bailey, J. A., Jeger, M. J. (eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, U.K. CAB International. pp. 308-325.
- Dórea, B.C.A. 2013. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. Associated with fruits in Brazil. Thesis of Doctor of Science in Plant Pathology. University of Sao Paulo “Luiz de Queiroz” College of Agriculture. Avenida Padua Dias 11, Piracicaba, Sao Paulo, Brasil. 70 p.
- Drori, N., Kramer-Haimovich, H., Rollins, J., Dinoor, A., Okon, Y., Pines, O., and Prusky, D. 2003. A combination of external pH and nitrogen assimilation affects secretion of the virulence factor pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Applied Environmental Microbiology* 69: 3258-3262.
- FAOSTAT 2014. Online statistical database of the Food and Agricultural Organization of the

- United Nations. <http://faostat.fao.org/>. Consultado 5 Diciembre 2014
- Fitzell, R. 1979. *C. acutatum* as a cause of anthracnose of mango in New South Wales. Plant Disease Report 63: 1067-1070.
- FRAC. 2014. FRAC Code List ©\*2014: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering), en Linea. P. 10. Revisado el 13 de diciembre de 2014. <http://www.frac.info/publication/anhang/2014%20FRAC%20Code%20List.pdf>
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1995. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity test. Applied and Environmental Microbiology 62: 1014-1020.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Disease 82: 596-605.
- Guillén, S.D, Téliz, O.D, Mora A.J.A, Sanchez, G.P y Gonzalez, H.V. 2003. Desarrollo temporal de epidemias de cenicilla (*Oidium mangiferae* Berthet) en huertos de mango (*Mangifera indica* L.) en Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 181-188.
- Guillén, S.D. 2000. Epidemiología de cenicilla (*Oidium mangiferae* Berthet) y Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) del mango en Michoacán. Tesis de Maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Edo. de México: 42 p.
- Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Angel, D., Gutiérrez-Alonso, J.G., Delgadillo-Sánchez, F. y Domínguez-Álvarez, J.L. 2002. Características Morfológicas, Culturales y Patogenicidad de Aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de Frutos de Guayaba (*Psidium guajava* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 20: 24-30.
- Gutiérrez, A.O. y Gutiérrez, A.J.G. 2003. Evaluación de resistencia a Benomil, thiabendazol y

- azoxistrobin para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21(2): 228-232.
- Holliday, P. 1995. Fungus diseases of tropical crops. Dover Publications, Inc. Nueva YORK, USA:.
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, 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: 147-183.
- Jeffries, P., Dodd, J.C., Jeger, M.J. and Plumbley, R.A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology 39: 343-366.
- Kim, Y.K., Kawano, T., Li, D. and Kolattukudy, P.E. 2000. Mitogen-activated protein kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. The Plant Cell 12: 1331-1343.
- Kumar, G.A. 2014. The genera *Colletotrichum*: an incitant of numerous new plant diseases in India. Journal on New Biological Reports 3: 09–21.
- Lardner, R., Johnston, P.R., Plummer, K.M. and Pearson, M.N. 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum sensu lato*. Mycological Research 103: 275-285.
- Latunde–Dada, A.O. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. Molecular Plant Pathology 2: 187–188.
- Lax, A.R., Templeton, G.E. and Meyer, W.L. 1985. Isolation, purification and biological activity of a self–inhibitor from conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. Phytopathology 75:

386-390.

- Lenné, J.M. and Burdon, J.J. 1990. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. *Phytopathology* 80: 728-731.
- Leyva-Mir, S.G., Soto, H.A., Espitia, R.E., Villaseñor, M.H.E., González, I.R.M. y Huerta, E.J. 2004. Etiología e incidencia de la antracnosis [*Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils.] de la avena (*Avena sativa* L.) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (3): 351-355.
- Lim, J., Heon, L.T. and Cha, B. 2002. Isolation and Identification of *Colletotrichum musae* from Imported Bananas. *The Plant Pathology Journal* 18: 161-164.
- Lima, N.B., Batista, M.V.A., Morais Junior, M.A., Barbosa, M.A.G., Michereff, S.J., Hyde, K.D., Câmara, M.P.S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 61(1): 75-88.
- Liu, B., Cai, L., Crous, P.W., and Damm, U. 2013 Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. *Mycologia* 105: 844-860.
- Martinez, E., Hío, J., Osorio, J., Torres, M. 2009. Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. *Agronomía Colombiana* 27: 211-218.
- Masel, A., Braithwaite, K., Irwin, J., and Manners, J. 1990. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Current Genetics* 18: 81-86.
- McMillan, R.T. 1986. Serious diseases of tropical fruits in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 99: 224-227.
- Meizhu, D., Schardl, C.L., Nuckles, E.M., Vaillancourt, L.J. 2005 Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species

- complexes. *Mycologia* 97: 641-658.
- Mercure, E.W., Kunow, H. and Nicholson, R.L. 1994. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* to corn leaves: A requirement for diseases development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 407-420.
- Miles, A.K., Willingham, S.L. and Cooke, A.W. 2004. Field evaluation of strobilurins and a plant activator for the control of citrus black spot. *Australian Plant Pathology* 33: 371-378.
- Mills, P.R., Hodson, A. and Brown, A.E. 1992. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical crops. In: *Colletotrichum : Biology, Pathology and Control*. Bailey, J. A. y Jeger, M. J. (eds.) Wallingford, U.K. CAB International. Pp: 269-288.
- Montero, T.V., Morales, G.J.L., González, M.M., Anaya, L.J.L., Corona, T.T. y Gálvez, M.A. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1: 159-174.
- Morales, J.L. 1996. Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate de Michoacán. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México: 96p.
- Munaut, F., Hamaide, N., Maraite, H. 2002. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. *Mycological Research* 106(5): 579-593.
- Nelson, S. 2008. Anthracnose of Avocado. College of Tropical Agriculture and Human Resources. Cooperative Extension Service. University of Hawaii at Manoa. 6p.
- Nieto, A.D., Gutiérrez, A.J.G., Gutiérrez, A.O., Téliz, O.D, Zavaleta, M.E, Delgadillo, S.F y

- Vaquiera, H. 2003. Evaluación de resistencia a Imazalil, Prochloraz y Azoxystrobin en aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz y Sacc. y control de la antracnosis del mango. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 379-383.
- Nitzan, N., Quick, R.A., Hutson, W.D., Bamberg, J. and Brown, Ch. 2010. Partial Resistance to Potato Black Dot, Caused by *Colletotrichum coccodes* in *Solanum tuberosum* Group Andigena. *American Journal of Potato Research* 87: 502-508.
- Noireung, P., Phoulivong, S., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Jones, E.B.G., Bahkali, A. and Hyde, K.D. 2012. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Mycologie* 33: 347–362.
- Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., Robles-González, M., Orozco-Romero, J., Pérez-Zamora, O., Velázquez-Monreal, J.J., Timmer, L. W. y Guzmán-González, S. 2006. Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Tecomán. Folleto Técnico Núm. 2. 73 p.
- O'Connell, R.J., Pain, N.A., Hutchison, K.A., Jones, G.L. and Green, J.R. 1996. Ultrastructure and composition of the cell surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Microscopy* 181: 204-212.
- Pegg, K.G., Coates, L.M., Korsten, L. y Harding, R.M. 2007. Enfermedades foliares del fruto y suelo. In: *El palto. Botánica, Producción y Usos*. Wiley, A. W., Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. (eds.). Ediciones Universitarias de Valparaíso. pp: 25-45.
- Peng, L.J., Sun, T., Yang, Y.L., Cai, L., Hyde, K.D., Bahkali, A.H., Liu, Z.Y. 2013. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience* 54: 29-41.
- Peres, N.A., Timmer, L.W. Adaskaveg, J.E., Correll, J.C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89: 784-796.

- Peres, N., Kurumae, E., Dias, M. and Souza de, N. 2002. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp., affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology* 150:128-134.
- Pérez, J.R.M. 2008. Significant Avocado Diseases caused by fungi and Oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2: 1-24.
- Perfect, N.A., Hughes, H.B., O'Connell, R.J. and Green, J.R. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27: 186-198.
- Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Lumyong, P., McKenzie, H.C. and Hyde, K.D. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18: 117-133.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E. and Hyde, K.D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44: 33-43.
- Ploetz, R.C. 1994. Panamá disease: return of the first banana menace. *International Journal of Pest Management* 40: 326-336.
- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* 34: 413-434.
- Prusky, D., McEvoy, J., Leverentz, R. and Conway, W. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology* 9: 1105-1113.
- Prusky, D.S. and Dickman, M.B. 2000. *Colletotrichum* host specificity, pathogenicity and host-pathogen interactions. The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. 392 p.

- Ranasinghe, L., Jayawardena, B. and Abeywickrama, K. 2005. An integrated strategy to control postharvest decay of Embul banana by combining essential oils with modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 90-103.
- Roca, M.M.G., Read, N.D. and Wheals, A.E. 2005. Conidial anastomosis in filamentous fungi. *FEMS Microbiology Letters* 249: 191-198.
- Rodríguez-Guerra, R., Acosta-Gallegos, J.A., González-Chavira, M.M. y Simpson, J. 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agricultura Técnica en México*. 32: 101-114.
- Rodríguez-López, E.S., Gonzalez-Prieto, J.M., Mayek-Pérez, N. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz.y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27(1): 53-63.
- Rojas, M.R.I., Zavaleta, M.E. Nieto, A.D. y Acosta, R.M. 2008. Virulence and genetic variation of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. on Mango (*Mangifera indica*) cv. Haden. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 21-26.
- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre del Ciclo 2013. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/> Publicado en enero del 2014. Acceso en enero del 2014.
- Silva-Rojas, H.V. y Ávila-Quezada, G.D. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology* 60: 899-608.
- Simmonds, J.H. 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science* 22: 437-459.



- Singh, N. 2008. Sustainable management of red rot disease of sugarcane. *Indian Sugar* 58: 21-30.
- Slawewski, R.A., Ryan, E.P. and Young, D.H. 2002. Novel fungitoxicity assays for inhibition of germination associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. *Applied Environmental Microbiology* 68:597-601.
- Smith, B.J. and Black, L.L. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease* 74: 69-76.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E., and Mills, P.R. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 265-281.
- Stanley, F., Talma, K. and Ezra, S. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. *Plant Disease* 82: 596–605.
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds.). pp: 1-26. CAB International. Wallingford, U. K.
- Swamy, J.S. 2012. Anthracnose: a devastating pre and post-harvest disease in mango. *International Journal Plant Protection* 5: 429-437.
- Talhinhas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2987-2998.
- Téliz, O.D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ed. Mundi Prensa México, S. A. de C. V. 1a Ed. 219 p.
- Téliz, O.D. y Mora, A.J.A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. Ed. Mundi Prensa México, S. A. de C. V. 2a Ed. 321 p.

- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O. and Taylor, P.W.J. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology* 57: 562-572.
- Ureña-Padilla A.R., MacKenzie S.J., Bowen B.W., and Legard D.E. 2002. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. *Phytopathology* 92, 1245-52.
- Vega, P.A. 1994. Enfermedades del mango (*Mangifera indica* L.) en el valle de Apatzingan, SARH-INIFAP. Mexico. 26p.
- Vidales-Fernandez. I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill.) Tesis Doctoral. Área Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad de Colima. Tecomán, Colima, México. 150 p.
- Waller, J.M., Lenne, J.M. and Waller, S.J. 2002. *Plant Pathologists's Pocketbook*. CABI, Wallingford, UK.
- Waller, J.M., Bridge, P. D., Black, B., and Hakiza, G. 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycological Research* 97: 989-994.
- Wardlaw, C.W. 1934. The nature and occurrence of pitting diseases and fruit spots. *Tropical Agriculture* 11: 8-13.
- Weir, B.S., Johnston, P.R. and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Micology* 73: 115–180.
- Wharton, P.S. and Diéguez, U.J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 3-22.
- Xiao, C.L., MacKenzie, S.J., and Legard D.E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of

*Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated host.

Phytopathology 94: 446-453.

Yakoby, N., Zhou, R., Kobilier, I., Dinoor, A., Prusky, D. 2001. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* restriction enzyme-mediated integration mutant as biocontrol agents against anthracnose disease in avocado fruits. Phytopathology 91: 143-148.

Yang Y.L., Liu, Z., Cai, L. and Hyde, K.D. 2012. New species and notes of *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. Fungal Diversity 39: 123-146.

Zulfiqar, M., Brlansky, R.H. and Timmer, L.W. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides*. Mycologia 88: 121-128.

## Capítulo II. Caracterización morfológica de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Leticia Robles-Yerena<sup>1</sup>, Daniel Nieto-Ángel<sup>1</sup>, Daniel Téliz-Ortiz<sup>1</sup>, J. Concepción Rodríguez Maciel<sup>2</sup>, Dr. Mario Orozco Santos<sup>3</sup>, Cristian Nava-Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230. <sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad-Entomología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230 <sup>3</sup>INIFAP – Campo Experimental Tecoman. Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecoman, Colima, México: 28930. [lrobles@colpos.mx](mailto:lrobles@colpos.mx)

### Resumen

La antracnosis del aguacate en México es causada por *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*. La enfermedad se presenta en todas las etapas fenológicas del cultivo y causa pérdidas entre un 20 a 50% según la susceptibilidad varietal, el clima y la virulencia del patógeno. En la presente investigación, se identificaron y caracterizaron morfológica y culturalmente 300 aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de aguacate con los síntomas de antracnosis colectados de las principales zonas productoras en México. *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* fueron identificados por la forma de los conidios. El 83% de los aislados presentaron conidios con extremos redondeados típicos de *C. gloeosporioides*; el 11% presentó conidios con un extremo redondeado y otro agudo, también característicos de *C. gloeosporioides*; el 6% presentó conidios con ambos extremos agudos típicos de *C. acutatum*. Otras características evaluadas, como el

diámetro de crecimiento, forma de la colonia, color de la colonia, presencia de anillos, tipo de micelio, presencia de setas, clamidosporas, ascosporas, longitud y ancho de los conidios variaron ampliamente sin definir un patrón característico para estas especies. El análisis multivariado nos permite suponer que existen más especies involucradas o se trata de un complejo de especies que requiere de estudios de patogenicidad e identificación molecular.

**Palabras clave:** antracnosis, *Persea americana*, especies complejo

## Chapter II. Morphological characterization of *Colletotrichum* spp. isolated from avocado fruits in Mexico

### Abstract

Avocado anthracnose in Mexico is caused by *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *C. boninense*. The disease occurs in all phenological stages of the crop and cause losses between 20-50% depending on the varietal susceptibility, climate and pathogen virulence. In this research, there were identified and characterized morphologically and culturally 300 isolates of *Colletotrichum* spp. isolated from avocado fruits with anthracnose symptoms collected from the main producing areas in Mexico. *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* were identified by the shape of the conidia. Eighty-three percent of the isolates showed typical conidia of *C. gloeosporioides* with rounded ends; 11% presented characteristic conidia of *C. gloeosporioides* with one rounded end and one acute; 6% presented both acute ends typical of *C. acutatum*. Other characteristics evaluated, as the diameter of growth, colony form, colony color, presence of rings, type of mycelium, presence of seta, chlamydospores, ascospores, length and width of conidia varied widely without defining a characteristic pattern for these species. Multivariate analysis allows us to assume that there are more species involved or is a complex of species requiring study pathogenicity and molecular identification.

**Key words:** anthracnose, *Persea americana*, complex species

## 2.1. Introducción

México ocupa el primer lugar en la producción de aguacate a nivel mundial. El principal estado productor es Michoacán (85% de la producción), seguido por Jalisco (3.1%), Morelos (2.7%), Nayarit (2.2%), México (2.1%), Guerrero (1.1%), Puebla (0.9%) (FAO, 2013). Uno de los factores más importantes que limitan la producción y exportación es la presencia de enfermedades fungosas, de las cuales, la más importante por el daño económico que causa es la antracnosis inducida por el hongo *Colletotrichum* spp. Este hongo afecta frutos, flores, tallos y hojas en muchas especies vegetales y en diferentes estados fenológicos, incluyendo la postcosecha.

*Colletotrichum gloeosporioides* originalmente fue descrito por Almeida en 1899 como *Gloeosporium*, pero después fue reclasificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc. (Arx, 1970), cuyo telemorfo corresponde a la especie *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. et Schrenk (Tamayo, 2007).

En la clasificación tradicional de los hongos, el género *Colletotrichum* se encuentra en el Reino Fungi, Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden aún no asignado, Familia Glomerellaceae (Catalogue of life, 2014), Mientras que la fase sexual, *Glomerella*, se clasifica en el Phylum Ascomycota, clase Ascomycetes, subclase Sordariomycetidae, orden *incertae sedis*, familia Glomerellaceae (Kirk *et al.* 2001).

En la identificación morfológico-molecular de especies de *Colletotrichum* que afectan aguacate a nivel mundial, se han registrado las siguientes especies: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. alienum*, *C. aenigma*, *C. firiniae*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C.*

*queenslandicum*, *C. simmondsii*, *C. siamense* y *C. tropicale* (Binyamini y Schiffmann, 1972; Barquero *et al.* 2013; Damm *et al.* 2012; Dórea, 2013; Hyde *et al.* 2009; Montero *et al.* 2010; Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011; Weir *et al.* 2012).

Para la identificación de las especies del género *Colletotrichum* en aguacate se han utilizado características morfológicas como: la forma y dimensión de los conidios, presencia o ausencia de setas y acérvulos (Sutton, 1980; Sutton, 1992) y culturales, tales como color de colonia, tipo de micelio, apresorios, desarrollo de peritecios con ascas y ascosporas (Freeman *et al.* 1998; Lardner *et al.* 1999; Sutton, 1992). Desafortunadamente el ambiente provoca una considerable variación patogénica y morfológica en el hongo y estos criterios por si solos no siempre son adecuados para la diferenciación confiable de las especies (Álvarez, 2014; Freeman *et al.* 1998). La identificación utilizando múltiples variables es la mas recomendada, por ejemplo Smith y Black (1990) fueron capaces de diferenciar a las especies de *Colletotrichum* que afectan fresa (*C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*) tomando en cuenta caracteres morfológicos culturales y de patogenicidad.

A la fecha no se ha realizado una investigación exhaustiva para determinar las especies del género *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis del aguacate en México. Además se desconocen los caracteres morfológicos primarios para su identificación y la preservación a largo plazo. Por otro lado se desconoce la proporción en la que se encuentran ocasionando esta enfermedad en nuestro país. Por ello se planteó la presente investigación con el objetivo de realizar una colecta a nivel nacional para aislar, caracterizar e identificar morfológica y culturalmente a los hongos asociados al síntoma de antracnosis en aguacate en México.



## **2.2 Materiales y Métodos**

### **2.2.1 Área de muestreo**

La investigación se inició con el muestreo en las zonas de mayor producción de aguacate en los estados de Michoacán, Morelos, Nayarit, México, Puebla y Jalisco, en altitudes que oscilan de 1957 a 2224 msnm. Los frutos, colectados en todos los estados fenológicos de desarrollo, con sin síntomas evidentes de antracnosis, fueron colocados en bolsas de polietileno y transportados en hilera.

### **2.2.2 Obtención de los aislados**

1) Fragmentos de tejido con la zona de avance de las lesiones en frutos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante 1min, lavados dos veces en agua destilada estéril y secados en papel sanita estéril durante 15 minutos. Una vez secos, se colocaron cinco fragmentos en cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA (Bioxon, PDA, 39g $L^{-1}$  de agua).

2) Los frutos colectados fueron incubados durante 15 días en el laboratorio hasta observar la esporulación del hongo en la lesión. Con una aguja de disección flameada, se tomó una muestra de las esporas que fue suspendida en 10ml de agua destilada estéril y 1ml de esta suspensión fue dispersada sobre el medio de cultivo PDA en una caja Petri con ayuda de un triángulo de vidrio (Echandi, 1971).

Las cajas Petri fueron selladas con Parafilm (Sigma-Aldrich) para evitar contaminación y

se incubaron a  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  con luz natural durante 72 horas. Los aislados obtenidos fueron inicialmente purificados por la técnica de punta de hifa, incubados bajo las condiciones antes señaladas durante 7 días o hasta observar esporulación. Estos mismos aislados fueron purificados por segunda ocasión con la técnica de cultivos monospóricos: Con una aguja de disección flameada se tomó una muestra de las esporas que fue suspendida en 10 ml de agua destilada estéril. La mezcla se homogenizó mediante agitación y 1 ml de esta suspensión se dispersó en una caja Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron durante 24 horas y bajo microscopio de disección se observaron las esporas que habían emitido un tubo germinativo y estas fueron transferidas a una nueva caja Petri con medio.

Los aislados se conservaron en: 1) Tubos ensayo inclinados con PDA y aceite mineral, 2) Tiras de papel filtro, 3) Frío a  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 20%. Para la primera técnica, un fragmento de  $3 \times 3$  mm fue colocado sobre el medio y se incubó en el laboratorio hasta que el monospórico colonizó toda la superficie. Después se le adicionó una capa de aceite mineral esterilizado hasta cubrir completamente el crecimiento. Los tubos tapados con algodón y sellados con Parafilm fueron almacenados a  $5^{\circ}\text{C}$ . Para la conservación en tiras de papel, en cajas de Petri con PDA se colocaron tres tiras de papel Whatman No 1 ( $5 \times 50$  mm) simulando un triángulo y en su centro se adicionó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con micelio del cultivo monospórico. Las cajas fueron incubadas en el laboratorio durante 7 días. Las tiras de papel con crecimiento fungoso fueron removidas con unas pinzas de disección flameadas y colocadas dentro de tubos de ensayo esterilizados de 25 ml. Los tubos tapados con algodón y sellados con Parafilm fueron almacenados a  $5^{\circ}\text{C}$ . En la tercera técnica de almacenaje, discos de PDA de 5 mm que contenían micelio de un monospórico fueron colocados en viales criogénicos con 1ml de glicerol al 20%. Los viales sellados se colocaron en una caja Sarstedt para ser conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Después de ocho meses de almacenamiento, una muestra de cada uno de los monospóricos en cada una de las técnicas de almacenamiento fue sembrada en una caja Petri con PDA. Las cajas fueron incubadas en el laboratorio a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  con luz natural durante 7 días. La viabilidad se evaluó como 1= viable, 0= no viable mientras que la contaminación se determinó con 0=no contaminada, 1=contaminada.

### **2.2.3 Identificación morfológica y morfométrica**

Discos de PDA de 5 mm de diámetro del margen de colonias de 7 días de edad se transfirieron a tres cajas Petri con PDA y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$ . Las variables MACRO evaluadas fueron: 1) Diámetro de crecimiento de la colonia a los 10 días. Dos días después se evaluó 2) Color de la colonia (1=blanco, 2=salmón, 3=gris, 4=café y 5=oscuro), 3) Tipo de micelio (1=aéreo, 2=plano), 4) densidad de micelio (3=denso, 4=escaso), 5) Anillos concéntricos de crecimiento (1=presentes, 2=ausentes), 6) Margen de la colonia (1=bordes ondulados 2=bordes lisos), 7) Formación de masas de conidios (1=presente, 2=ausente). Las variables MICRO evaluadas fueron 8) Tipo de micelio (1=sin septas evidentes, 2=con septas; 3=con y sin septas), 9) Setas (1=presente, 2=ausente), 10) Ascosporas (1=presente, 2=ausente), 11) Clamidiasporas (1=presente, 2=ausente). En 50 conidios se evaluó 12) Tipo de conidios (1=extremos redondeados, 2= un extremo redondeado y otro agudo, 3=extremos agudos), 13) Largo mínimo, 14) Largo promedio, 15) Largo máximo, 16) Ancho mínimo, 17) Ancho promedio, 18) Ancho máximo. Para las variables MICRO, una muestra de micelio y esporulación se colocaron sobre una gota de glicerol 50% en el centro del portaobjetos con un cubreobjetos sellados con barniz transparente para ser observada y fotodocumentada en un microscopio compuesto Velab con el objetivo 100X y con ayuda del programa Motic plus, versión 2 (Motic, USA).

#### **2.2.4 Diseño experimental**

La identificación morfológica y morfométrica se hizo bajo un diseño experimental completamente aleatorizado con 300 tratamientos y tres repeticiones de cada uno de ellos. Las cajas Petri se colocaron sobre la mesa de trabajo de manera aleatoria y estuvieron expuestas a las mismas condiciones ambientales. Con la finalidad de hacer mas fácil la interpretación de los resultados se calcularon las variables descriptivas de la población y las frecuencias. Además se llevó a cabo un análisis multivariado por clusters para determinar las variables más utiles para la identificación así como un dendograma del agrupamiento para conocer cuantas especies se encuentran involucradas en el síntoma de antracnosis en aguacate en México. Todos los procedimientos matemáticos se llevaron a cabo usando el paquete de análisis estadístico SAS® System for Windows V9, 2002.

#### **2.2.5 Identificación**

La identificación de los aislados de frutos de aguacate de los principales estados productores de México se basó en variables morfológicas y morfométricas así como el agrupamiento derivado del análisis multivariado comparado con las descripciones y claves de Bailey *et al.* (1992), Bailey *et al.* (1996), Bailey y Jeger (1992), Barnett y Hunter (1998), Sutton (1980) y Sutton (1992).

## 2.3 Resultados y Discusión

Se obtuvo una colección de 300 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. de síntomas de antracnosis en frutos de aguacate. La colección más grande de este género al 2015. Los cultivos provienen de los estados de:

- Michoacán: 54 cultivos monospóricos de los municipios de Uruapan, Ario de Rosales, Periban, Salvador Escalante, Tacámbaro, Tancitaro, Zitácuaro y Charapan.
- Morelos: 56 cultivos monospóricos de los municipios de Ocuituco, Tétela del volcán, Yecapixtla, Tlanelpantla, Totolapan y Zacualpan.
- Nayarit: 39 cultivos monospóricos de los municipios de Xalisco, Tepic, San Blas, Santa María del Oro e Ixtlan del Rio.
- México: 35 cultivos monospóricos de los municipios de Coatepec de Harinas, Almoloya de Alquisiras, Villa Guerrero, Tenancingo, Donato Guerra y Villa de Allende.
- Puebla: 70 cultivos monospóricos de los municipios de Atlixco, Zacapala, Tepexi de Rodríguez, Quimixtlán y Tochimilco.
- Jalisco: 46 cultivos monospóricos de los municipios de Zapotlán el Grande, Tamazula de Gordiano, Tuxpan, Gómez Farías, Zapotiltic, Sayula y Escaltitlan.

Al momento de llevar a cabo la reactivación de los aislados, después de 8 meses de almacenamiento, se observó que el 100% de ellos estaba viable independientemente de la técnica de almacenamiento utilizada (Tubos ensayo inclinados con PDA y aceite mineral; Tiras de papel filtro; Frío a -80 °C). El 5% de los aislados presentaba contaminación (*Penicillium* sp.). Saldarriaga *et al.* (2008) mencionaron que al reactivar sus aislados observaron contaminación por *Pseudomonas*. Botero *et al.* (2001) mencionan que más que una contaminación con otros

organismos debería ser denominada como una asociación, pues *Colletotrichum* es estimulado en su germinación y formación de apresorios por los “contaminantes”, así favoreciendo el proceso de infección.

Todos los aislados crecieron bien en PDA. A los seis días de siembra, el 43% de los aislados había cubierto el 43% de la superficie del medio de cultivo. A los 10 días, el 100% de los aislados habían cubierto entre 68 y 100% de la superficie del medio. Andrades *et al.* (2009) reportaron que el 30% de sus aislados de *Colletotrichum* en solo 5 días cubrían del 50 al 100% de la superficie del medio en la caja de Petri. Villanueva-Arce *et al.* (2008) no encontraron diferencias en el crecimiento en PDA entre *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, por lo que concluyeron que esta variable no puede ser considerada como un factor de separación entre las dos especies.

De acuerdo a nuestros resultados el diámetro de las colonias y la tasa de crecimiento por día fue similar para todos los aislados, independientemente de su origen geográfico. A los diez días de incubación, las colonias tenían un diámetro de 10-80mm. Domínguez-Guerrero *et al.* (2012) reportaron que 15 aislados de *Colletotrichum* de frutos de palma aceitera, tuvieron un diámetro medio de 73mm a 10 días de incubación. El diámetro de las colonias de *Colletotrichum* varía entre 48 y 73mm (Muños *et al.* 2003). El diámetro de las colonias de *C. aenigma* varía de 30-35mm, el de *C. alienum* de 85mm, el de *C. kahawae* subsp. *ciggaro* oscila de 75 a 85mm y las colonias de *C. kahawae* var. *migrans* varían de 48-49mm de diámetro después de 10 días de incubación (Weir y Johnston, 2009). Rojas *et al.* (2010) mencionaron que *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. tropicale* y *C. siamense* son de lento crecimiento. Damm *et al.* (2012) reportaron que las colonias de *C. boninense* tienen de 25 a 29mm de diámetro después de 7 días en medio de cultivo SNA mientras que *C. acutatum* forma colonias de 31-33mm después de 10 días de incubación.

La tasa de crecimiento por día varió de 22 mm/día (aislamiento 242 de Quimixtlán, Puebla) a 73 mm/día en el aislamiento 261 de Tamazula de Gordiano, Jalisco. Estas tasas de crecimiento observadas son similares a las reportadas por Saldarriaga *et al.* (2008), quienes reportan de 11 a 31 mm/día para sus aislados. Algunas especies de *Colletotrichum* pueden separarse utilizando la tasa de crecimiento. Por ejemplo, Denoyes y Baudry (1995) separaron 16 aislados aislados de fresa, identificando a 14 como *C. acutatum* (de lento crecimiento), y 2 como *C. gloeosporioides* (de rápido crecimiento).

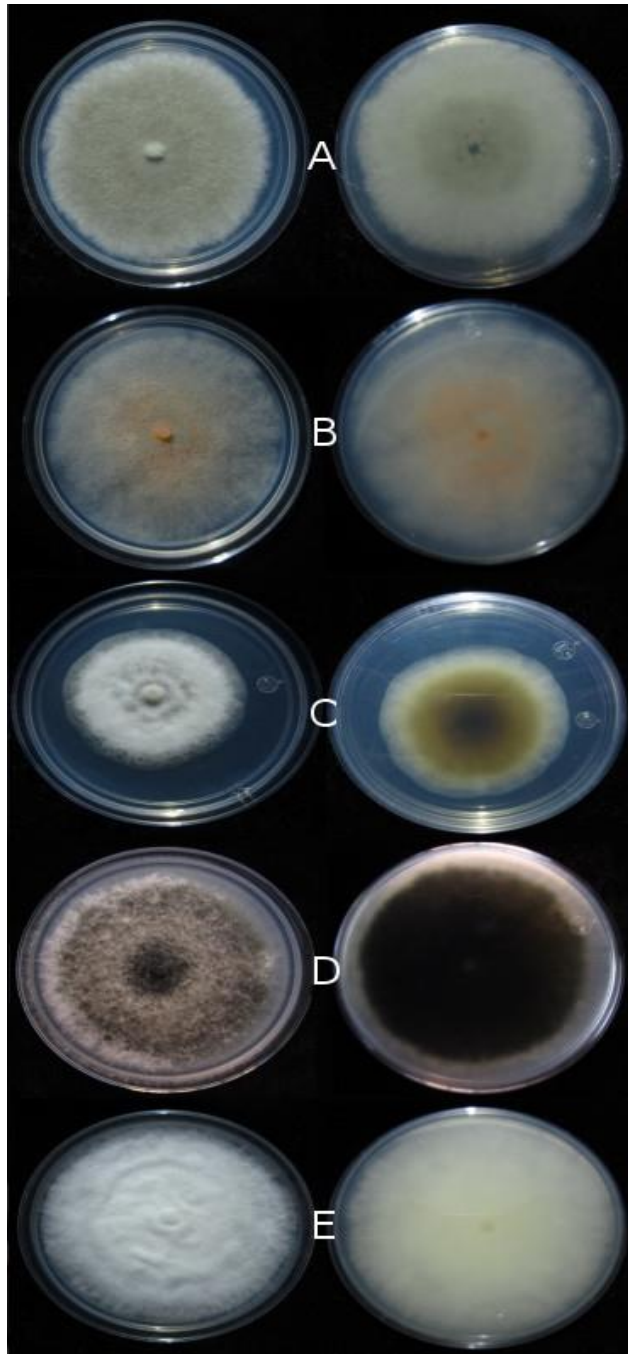
De acuerdo a las variables de porcentaje de cobertura, crecimiento y tasa de crecimiento es posible que *Colletotrichum* aislado de aguacate en México tenga poca variabilidad. Esto es diferente a lo observado por Morales *et al.* (2009), quienes afirman haber encontrado 19 variantes en crecimiento en sus colonias de *Colletotrichum* aislado de Michoacán. Sin embargo, no mencionan información detallada de estas variantes que nos permita compararla con la encontrada en nuestro estudio.

La coloración se evaluó en colonias que crecieron en PDA a 28°C durante 12 días. En general, los aislados exhibieron coloración variable a través del tiempo. Inicialmente era blanca, pero después se tornaba oscura. Saldarriaga *et al.* (2008) y Gunawardhana *et al.* (2009) reportan este mismo fenómeno asentando que las colonias blancas con el tiempo se tornan gris a oscuro. Del total de nuestros aislados, el 48% presentó coloración gris, 16% eran de color salmón, 13% fueron de color café, 12% oscuro y 11% blanco (Figura 1). Domínguez-Guerrero *et al.* (2012) reportan un fenómeno muy similar al encontrar 50% de sus colonias de color gris oliva, gris claro y gris oscuro y el otro 50% de otros colores. Saldarriaga *et al.* (2008) obtuvieron 36% de aislados de color gris-naranja, 12% naranja-blanco y 9% blanco. Andrades *et al.* (2009) mencionan que en

aislados de guanábana se presentaron colonias de *Colletotrichum* de color gris oscuro, blanco, crema y naranja claro. Živković *et al.* (2010) reportan colonias de color blanco, blanco crema, gris pasando a gris oscuro. Chowdappa *et al.* (2012) mencionan que aislados de color blanco a gris, naranja o rosa a gris oscuro con un reverso blanco, gris oscuro o naranja. Muños *et al.* (2003) reportan que el color que predominó en sus aislados fue el negro y blanco. Pérez *et al.* (2003) afirman que el 61% de las colonias son lilas, el 24% fue color salmón, 9% fueron moradas y 6% son color crema, teniendo como característica la atenuación del color a medida que aumentaba la edad del cultivo. La variabilidad en la coloración de los aislados del hongo es considerada normal y ha sido registrada por más autores como Vinnere (2004), Wharton y Diéguez (2004) y Freeman *et al.* (1998). Esta variación en color puede ser debida a los diferentes hospederos que ataca, clima, sitio de aislamiento, medio de cultivo, temperatura de incubación, etc. (Adaskaveg y Hartin, 1997).

A pesar de esta gran variación en color, Agostini *et al.* (1992) mencionan que el color de la colonia puede ser útil para la separación de las especies de *Colletotrichum*, por supuesto apoyándose en criterios adicionales como forma y tamaño de conidios. Villanueva-Arce *et al.* (2008) afirman que *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. orbiculare* forman colonias inicialmente blancas posteriormente salmón-naranja-rosa y finalmente gris o gris-olivo. Weir y Johnston (2009) reportan que *C. aenigma* se caracteriza por formar colonias blancas a naranja con los bordes incoloros, mientras que *C. alienum* forma colonias color gris con manchas irregulares de color gris oscuro o naranja en el envés. Los mismo autores mencionan que *C. kahawae* se caracterizan por formar colonias color rosado-naranja con manchas negras dispersas irregularmente. Damm *et al.* (2012) reportan que *C. boninense* forma colonias blancas con un envés color canela, rosa, gris mientras que *C. acutatum* forma colonias blancas, después de color rosa y salmón debido a la esporulación.

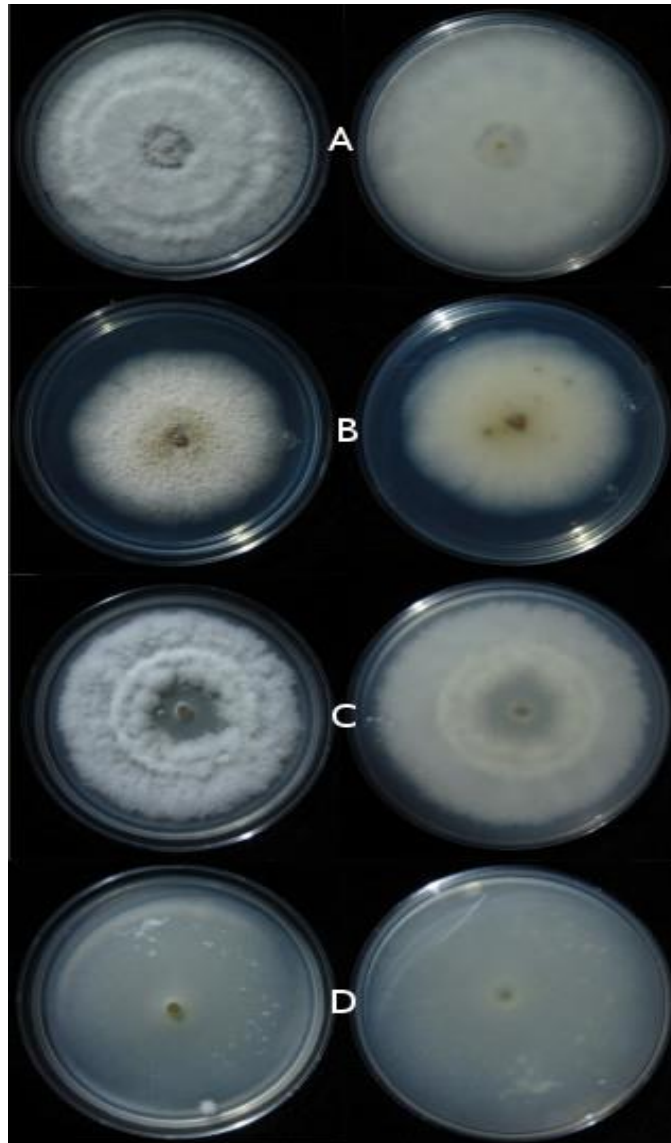




**Figura 1.** Variación en color de las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Vista del anverso y reverso de colonias de color gris (A), salmón (B), café (C), oscuro (D) y blanco (E).

El 77% de los aislados presentaron micelio aéreo y el 23% presentó micelio plano. Se observó que el 58% de los aislados tuvo un micelio denso y el 42% mostró un micelio escaso (Figura 2). Gunawardhana *et al.* (2009) mencionan que la mayor parte de los aislados de *C. gloeosporioides* que obtuvieron presentaron micelio aéreo y denso. Oliveira *et al.* (2005) menciona que en sus aislados el micelio era aéreo y abundante. Domínguez-Guerrero *et al.* (2012) reportan que el 80% de sus aislados tuvieron micelio inicialmente liso y después aéreo y denso y solo el 20% con micelio subaéreo y plano. Živković *et al.* (2010) indican que sus colonias de *Colletotrichum* aisladas de tomate se presentó el micelio aéreo y denso.

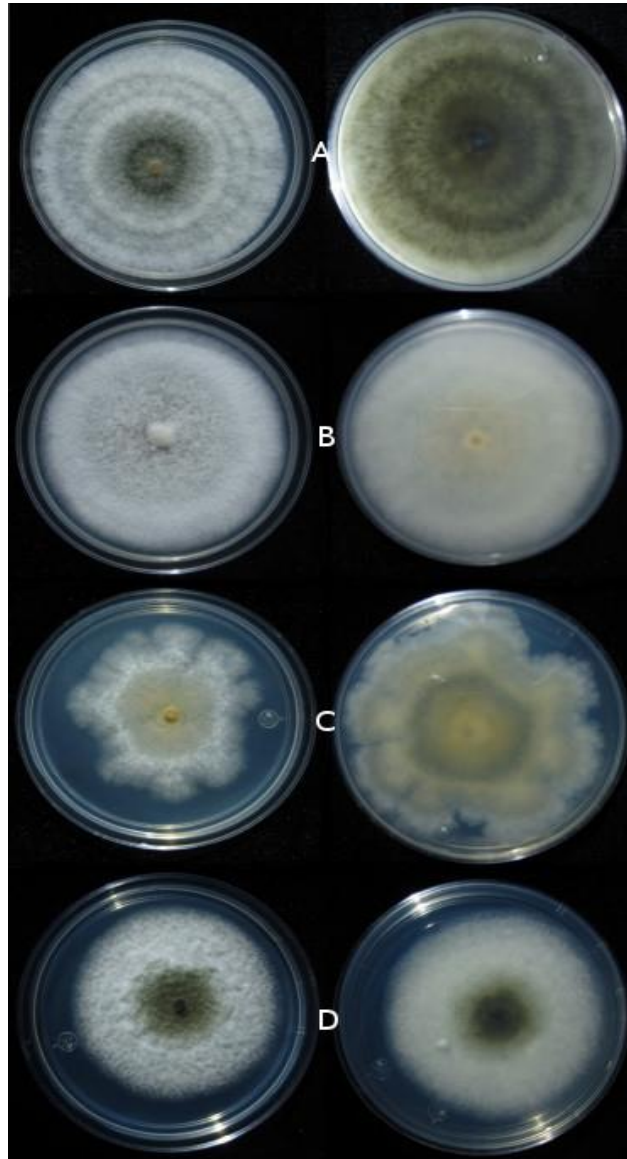
También se han notado algunas diferencias de crecimiento entre las diferentes especies, por ejemplo, Villanueva-Arce *et al.* (2008) mencionan que *C. gloeosporioides* produce micelio superficial o ligeramente aéreo y denso mientras que *C. fragariae* y *C. orbiculare* produce micelio poco denso a denso pero siempre aéreo. Weir y Johnston (2009) mencionan que *Colletotrichum aenigma* aislada de aguacate en Israel produce micelio aéreo, escaso, algodonoso, pero *C. alienum* tiene micelio aéreo, denso, algodonoso y en *C. kahawae* se observó micelio algodonoso, aéreo, denso. Finalmente, Damm *et al.* (2012) reportan la producción de micelio aéreo para *C. boninense* y *C. acutatum*.



**Figura 2.** Variación en crecimiento de micelio sobre medio de cultivo PDA de las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Vista del anverso y reverso de las colonias mostrando micelio aéreo (A), plano (B), denso (C) y escaso (D).

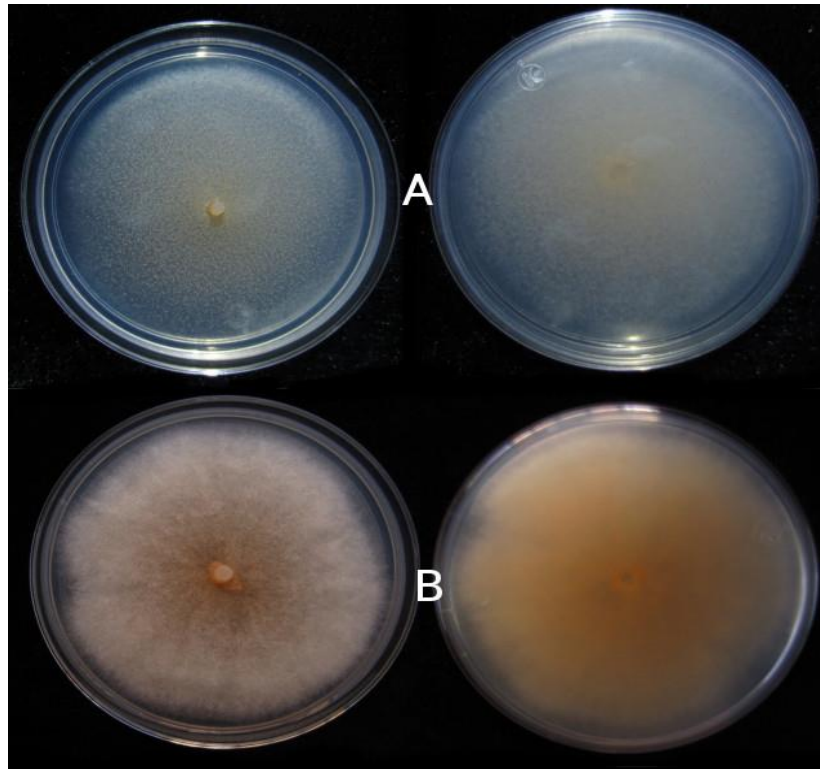
En general, todos los aislados mostraron un crecimiento de la colonia circular, con el margen ondulado y presencia anillos concéntricos (Figura 3). De acuerdo a nuestras observaciones, los anillos corresponden a las variaciones de temperatura y luz que ocurren durante el día. Andrades *et al.* (2009) reportan colonias circulares con bordes pocos definidos como las observadas en este estudio. Damm *et al.* (2012) reportan que *C. boninense* produce una colonia

plana y ligeramente ondulada mientras que *C. acutatum* tiene un crecimiento plano con margen entero. Morales *et al.* (2009), Pérez *et al.* (2003) y Saldarriaga *et al.* (2008) observan que algunos de sus aislados formaron anillos de crecimiento y Weir y Johnston (2009) reportan que *C. aenigma* no forma anillos en el medio de cultivo.



**Figura 3.** Variación en anillamiento y borde de las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Vista del anverso y reverso de las colonias mostrando formación de anillos (A), sin formación de anillos (B), colonias de borde ondulado (C), y con borde liso o circular (D).

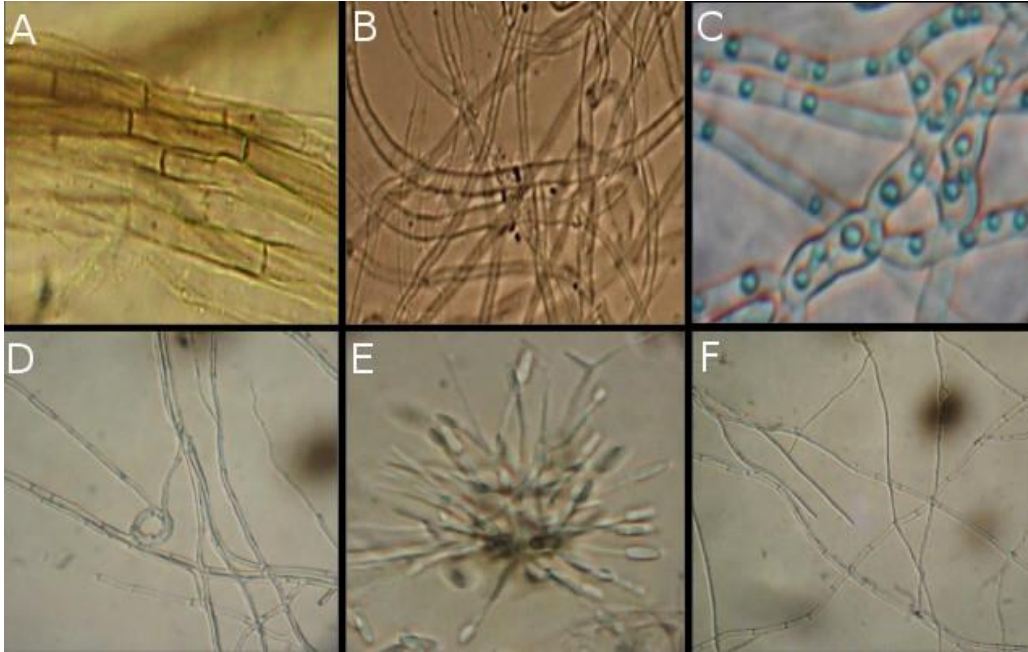
El 100% de los aislados produjeron conidios. Sin embargo, solo el 13% presentaron masas de conidios color salmón en el centro de la colonia en medio de cultivo PDA. Živković *et al.* (2010) reporta un bajo porcentaje de aislados que forman masas de conidios bajo las mismas condiciones de nuestra investigación. Dentro de los factores que favorecen la formación de masas de conidios se encuentran la temperatura, pH, luz, y proporción entre carbono y nitrógeno en el medio de cultivo (Jacson y Bothas, 1990; Jacson y Schisler, 1992). También la exposición corta a irradiación UV estimula la producción conidial. Otros factores que afectan la formación de masas de conidios son el método de inoculación y la cantidad de medio. Jacson y Slinger (1993) comprobaron que la composición de aminoácidos presentes en el medio también puede influir en la esporulación. Pérez *et al.* (2003) menciona haber obtenido abundante esporulación bajo condiciones de oscuridad constante. Por otro lado, el hecho de que los aislados no esporulen puede ser un indicio de la especie a la que pertenecen, por ejemplo, Weir y Johnston (2009) reportan que *C. aenigma* no produce masas de conidios, *C. alienum* sí produce numerosos esporoquios, oscuros y naranjas visibles a través del micelio y *C. kahawae* presenta masas estromáticas oscuras asociadas al micelio. Damm *et al.* (2012) reportan que *C. boninense* presenta colonias de crecimiento lento con esporulación y en *C. acutatum* la esporulación es de color anaranjado.



**Figura 4.** Variación en la esporulación las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Vista del anverso y reverso de las colonias mostrando colonias sin la formación de masas de conidios (A) y con la formación de masas de conidios (B).

El micelio de las colonias era de color marrón, septado y nucleado (Figura 5). El micelio estaba compuesto por dos tipos de hifas: largas que colonizaban el medio de cultivo y cortas especializadas en la producción de conidios. Estas características observadas en los aislados obtenidos de los principales estados productores de México coinciden con los descritos por Saldarriaga *et al.* (2008) y Chowdappa *et al.* (2012) quienes reportan micelio de hialino a marrón, septado con presencia de hifas largas y cortas especializadas. Živković *et al.* (2010) reporta además micelio ramificados, hialino y septado, siendo que estas ultimas se presentan después de 10 días de incubación. Respecto a la identificación de especies, Damm *et al.* (2012) mencionan que *C. boninense* tiene un micelio de 1.6  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color hialino o marrón pálido, con paredes lisas, septado y ramificado, con formación de conidióforos, hialinos o de color marrón

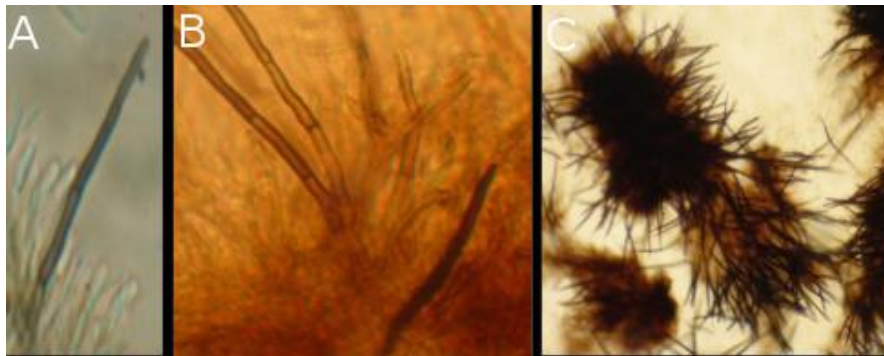
pálido, simples o septados, ramificados y no ramificados, de 40  $\mu\text{m}$  de largo mientras que *C. acutatum* produce hifas vegetativas de 1-5.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, hialinas, de pared lisa, septadas, ramificadas y conidióforos hialinos, simples, a veces septados y ramificados de 25  $\mu\text{m}$  de largo con células conidogénicas de paredes lisas, cilíndricas a ligeramente abultadas.



**Figura 5.** Variación del micelio de las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Micelio septado (A), Micelio joven sin septas aparentes (B), Micelio nucleado (C), Micelio diferenciado (D), esporodoquio con conidióforos y conidios (E) e hifas largas (F).

Por definición, las setas son hifas de crecimiento determinado, de pared gruesa, oscuras y esferiles (Kirk *et al.* 2001). La descripción del género *Colletotrichum* (Barnett y Hunter, 1998) menciona que este hongo produce setas tanto en el hospedante como en medio de cultivo. En los aislados obtenidos, solo el 7% presentaron setas dentro de esporodocios en medio de cultivo (Figura 6). Oliveira *et al.* (2005) reporta este mismo fenómeno, pero Morales *et al.* (2009) reporta una variación extrema en sus aislados. También hay reportes de la nula producción de setas, por ejemplo, Gutiérrez *et al.* (2002) menciona que no observaron setas en sus aislados a pesar de

haberlos colocado en diferentes medios de cultivo. Por otro lado, la producción de setas en medio de cultivo puede ser un caracter para útil en la identificación de las especies, por ejemplo, Villanueva-Arce *et al.* (2008) reportan la presencia de setas largas (290  $\mu\text{m}$ ) en *C. fragarie* mientras que las setas son cortas (11-155  $\mu\text{m}$ ) o ausentes en *C. gloeosporioides*. Sutton (1992) también menciona que no todos los aislados de *C. gloeosporioides* producen setas y que su formación esta en función de la humedad relativa y de las condiciones de incubación del aislamiento. Damm *et al.* (2012) reportan que *C. boninense* produce setas de color marrón, de lisas a verrucosas, con 1-2 septas, de 20-60  $\mu\text{m}$  de largo, con la base cilíndrica, cónicas o ligeramente abultada (3-7  $\mu\text{m}$ ), con punta redondeada mientras que las setas estan ausentes en *C. acutatum*.

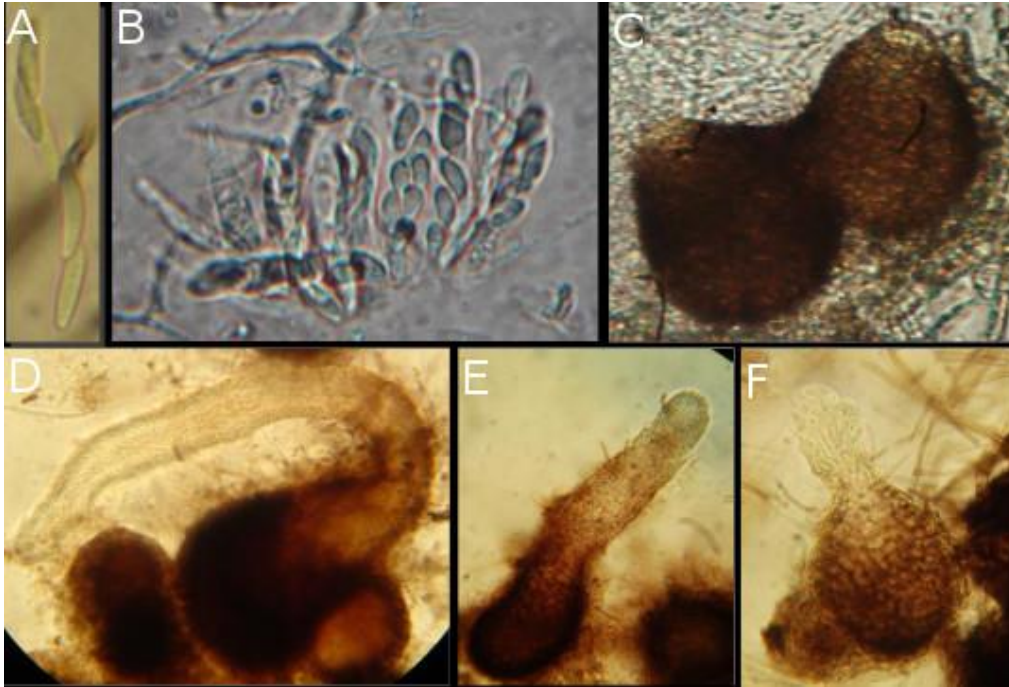


**Figura 6.** Variación de setas presentes en las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Setas solitaria (A), Fasciculo de setas septadas mostrando la base bulbosa (B) y Produccion masiva de setas (C)

La fase sexual de *Colletotrichum* corresponde al género *Glomerella* y se caracteriza por la producción de ascas unitunicadas y ascosporas dentro de un peritecio (Mordue, 1971). La producción de la fase sexual se ha relacionado con la liberación de sustancias que inhiben la formación de conidios (Wheeler, 1956). En esta investigación, solo el 19% de la población formó peritecios en medio de cultivo PDA despues de 12 días de incubación a 28°C (Figura 7). Weir y

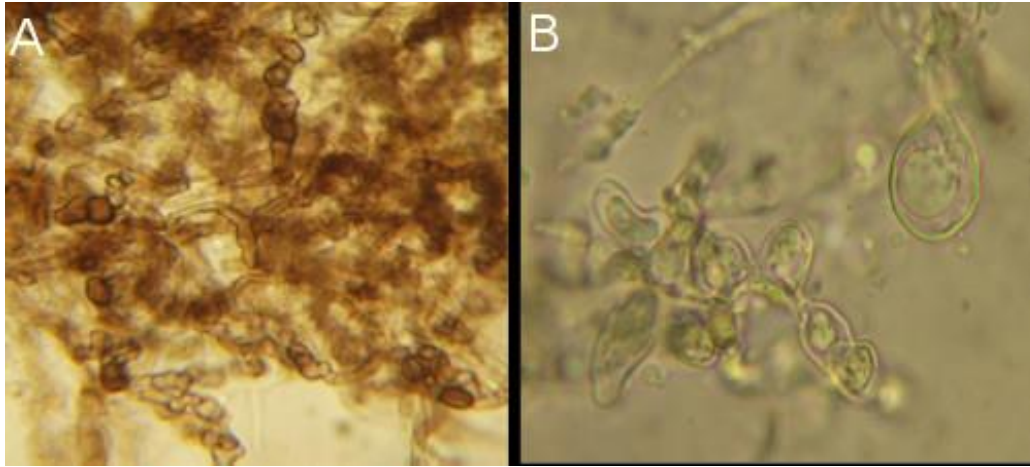


Johnston (2009) reportan que *C. alienum* forma peritecios en la mayoría de los aislados después de tan solo 10 días de incubación. Los peritecios que forma esta especie son de paredes oscuras, globosos cortos, con cuello estrecho ostiolar. Dentro se encuentran ocho ascosporas de 14-22 x 4-6µm, cilíndricas, curvadas, ligeramente agudas en los extremos. *C. kahawae* es otra de las especies que produce numerosos peritecios en grupos o individuales, globosos, de 250µm de diámetro, con un cuello ostiolar corto con ascas de 55-100 x 10-12µ con ocho ascosporas de 13-24 x 4-6.5µm, ligeramente curvada, con los extremos agudos y redondeados. *C. boninense* también produce peritecios subglobosos a piriformes, de color marrón, de 100-300 x 100-200µm, ostiolados, de cuello de hialino a marrón, de 100µm de longitud con ascas cilíndrico clavadas de 45-60 x 12.5-17µm, conteniendo ocho ascosporas, septadas (1-3 septos), de 12-18 x 4-6.5µm, con el ápice truncado y una pequeña alteración en el anillo apical (Damm *et al.* 2012).



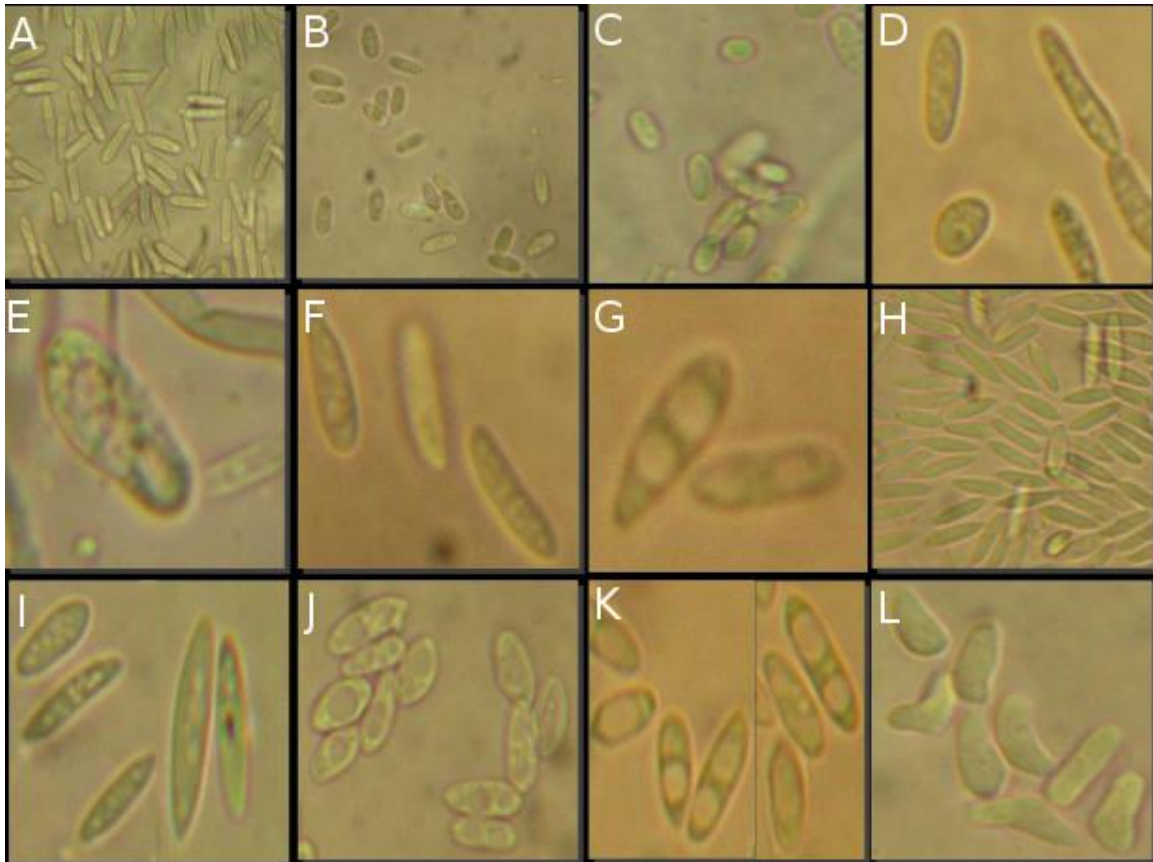
**Figura 7.** Variación en peritecios, ascas y ascoporas presentes en las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Ascoporas (A), ascas (B), peritecios de ostiolo corto (C) y peritecios de ostiolo largo (D-F).

Las clamidosporas son esporas de paredes gruesas que el hongo produce como una estructura de resistencia a condiciones adversas. En el 85% de los aislados obtenidos se observaron clamidosporas intercalares o terminales, de forma irregular y tamaño variable después de 12 días de incubación en medio de cultivo PDA (Figura 8). Saldarriaga *et al.* (2008), menciona que sus aislados producen clamidosporas intercalares o terminales después de 4 o 7 días, mientras que Damm *et al.* (2012) reportan que *C. boninense* y *C. acutatum* no producen clamidosporas.



**Figura 8.** Variación en las clamidosporas presentes en las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Clamidosporas en cadena (A) y detalle de las clamidosporas (B).

El 83% de los aislados obtenidos de aguacate de los principales estados productores de México producen conidios unicelulares, hialinos, con extremos redondeados, el 11% se presentó conidios con un extremo redondeado y el otro agudo y el 6% produce conidios con ambos extremos agudos (Figura 9). Gutiérrez *et al.* (2002), Oliveira *et al.* (2005) y Saldarriaga *et al.* (2008) reportan que prácticamente todos sus aislados de aguacate producían conidios con extremos redondeados, los cuales son característicos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Otras especies que producen este tipo de conidios son *C. aenigma*, *C. boninense* y *C. alienum* pero los conidios son cortos y en *C. kahawae* se estrechan ligeramente hacia la base (Damm *et al.* 2012; Weir y Johnston, 2009). Rojas *et al.* (2010) mencionaron que los conidios de *C. tropicale* y *C. siamense* también tienen ambos extremos redondeados pero se pueden diferenciar por que son cortos y anchos. Damm *et al.* (2012) indicaron que *C. acutatum* es una de las pocas especies que produce conidios con ambos extremos agudos.

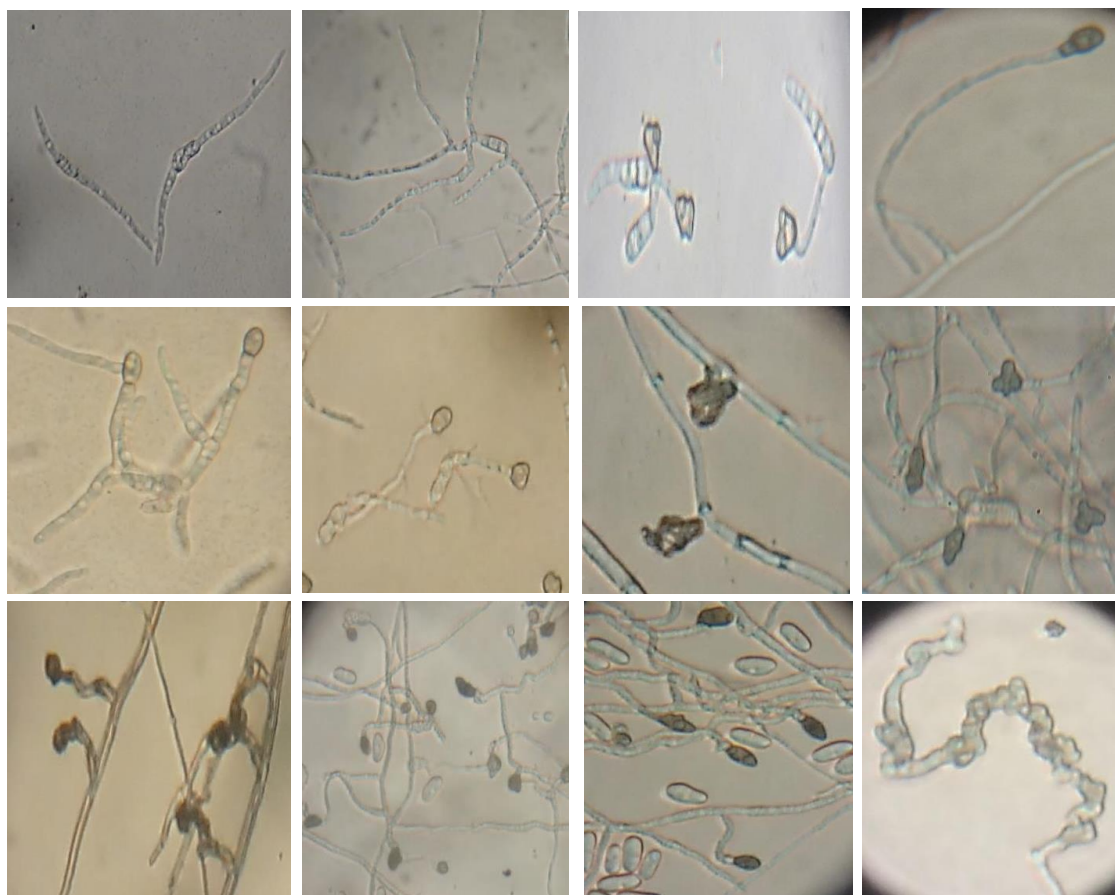


**Figura 9.** Variación en los conidios presentes en las colonias de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Conidios con ambos extremos redondeados (A-E), conidios con un extremo redondeados y uno agudo (F-G), conidios con ambos extremos agudos (H-K) y malformaciones (L).

La longitud de los conidios de las colonias de *Colletotrichum* obtenidas de aguacate de los principales estados productores de México varió de 4.3 a 28.3  $\mu\text{m}$  mientras el ancho osciló de 1.7 a 8.6  $\mu\text{m}$ . Una comparación de medias nos permitió visualizar que existen diferencias y grupos entre los aislados. En el primer grupo se encontraron como representantes a los aislados MichTanc32 (22.1-28.3 x 6.4-8.6  $\mu\text{m}$ ) y JalZapotil280 (13.5-27.6 x 3.7-6.0  $\mu\text{m}$ ); en el segundo grupo se ubican los aislados PueQuimix233 (6.1-7.2 x 4.4-5.7  $\mu\text{m}$ ), PueQuimi231 (4.2-7.8 x 2.0-4.3  $\mu\text{m}$ ), JalZapotil281 (6.3-9.3 x 4.0-6.3  $\mu\text{m}$ ) y MichArio11 (5.6-9.8 x 2.8-6.7  $\mu\text{m}$ ). Muñoz *et al.* (2003), Živković *et al.* (2010) y Chowdappa *et al.* (2012) reportan que *C. gloeosporioides* tiene

conidios con dimensiones que oscilan de 7.6-25.25 x 3.2-7.5  $\mu\text{m}$ . Gutiérrez *et al.* (2002) reporta dimensiones menores en los conidios de *Colletotrichum* encontrados en Zitácuaro, Michoacán (11.46 x 4.70  $\mu\text{m}$ ) siendo posible que sus datos no coinciden con los encontrados en esta investigación por el reducido numero de aislados que realizaron (seis). Damm *et al.* (2012) y Weir y Johnston (2009) reportaron las dimensiones de varias especies que atacan aguacate: *C. aenigma* (12.0-16.5 x 5.0-7.5  $\mu\text{m}$ ), *C. alienum* (12.5-17.5 x 3.5-6.0  $\mu\text{m}$ ), *C. kahawae* (12.0-19.5 x 4.5-8.0 $\mu\text{m}$ ), *C. boninense* (8.5-17.5 x 4-6.5  $\mu\text{m}$ ) y *C. acutatum* (8.5-17.5 x 3.0-4.5  $\mu\text{m}$ ).

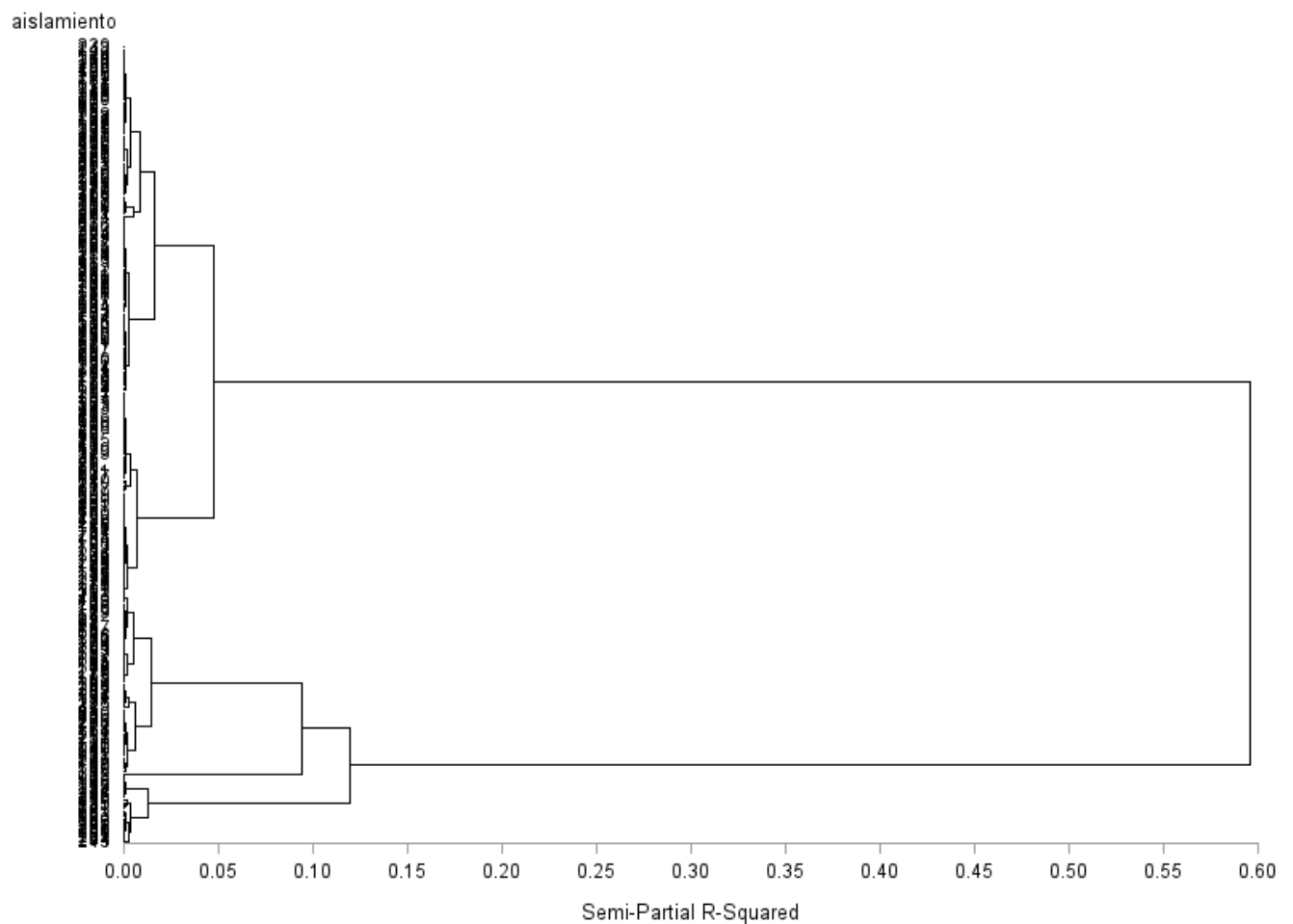
Los apresorios formados de los conidios de las colonias de *Colletotrichum* obtenidas de los principales estados productores de México se caracterizaron por ser irregulares, ovoides y oscuros. También se observaron conidios secundarios en sustitución del apresorio (Figura 10). Oliveira *et al.* (2005), Sutton (1980) y Sutton (1992), Villanueva-Arce (2008) y Živković *et al.* (2010) reportan que los apresorios para las tres especies de *Colletotrichum* que atacan chirimoya son simples, ovados o clavados, de color claro a marrón oscuro. Se ha encontrado (Walker *et al.* 1991) que los apresorios no son determinantes en la identificación de estas tres especies. Sin embargo, pueden ser una característica mas que contribuya a la identificación de las especies. Weir y Johnston (2009) reportan que *C. aenigma* produce apresorios de 6-10  $\mu\text{m}$  de diámetro, subglobosos y con lóbulos amplios. *C. alienum* produce apresorios simples, globosos, cortos, pocos con lobulos irregulares amplios. *C. kahawae* forma apresorios cilíndricos a fusiformes en formas lobuladas. Rojas *et al.* (2010) indican que *C. tropicale* y *C. siamense* tienen apresorios simples. Damm *et al.* (2012) que *C. boninense* forma apresorios solitarios o en cadenas cortas, color marrón, de paredes gruesas, de borde entero o crenado, rara vez lobulados, de forma irregular comunmente en forma de proyectil de 4.5-18 x 4-11  $\mu\text{m}$ .



**Figura 10.** Variación en los apresorios formados por conidios de *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Conidio germinado (A-B), formación de apresorios a partir de un conidio germinado (C), apresorio solitario (D), apresorios múltiples (E), apresorios lobulados (F-I), Variación de apresorios (I-K) apresorios en cadena (L).

Al observar los resultados del análisis multivariado se encontró un eigenvalue de 0.55 a los seis clusters o grupos. Esta información se confirmó al revisar el valor de la Pseudo F que alcanzó un punto máximo de 443 a los cinco grupos o clusters. Con estos valores se puede aseverar que al analizar simultáneamente las 18 variables evaluadas, los trecientos aislados se pueden clasificar en tan solo 5 grupos (Figura 11). Es innegable que la caracterización morfológica y en especial la morfométrica de los conidios son variables sumamente útiles para la identificación de las especies

de *Colletotrichum* (Sutton, 1980; Sutton 1993). Sin embargo, nuestros datos presentan un panorama diferente. Además de ubicar dos grandes grupos (que corresponden a las dos especies identificadas como agentes causales de antracnosis en aguacate en este estudio: *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*) se pueden diferenciar subgrupos. Esto implica que se trata de dos especies complejo que contienen posiblemente a más especies ocultas por que que se requiere de más estudios para poder identificar a nivel especie cada uno de ellos.



**Figura 11.** Dendrograma del analisis multivariado de 18 variables evaluadas en *Colletotrichum* aisladas de aguacate de los principales estados productores de México. Se ubican facilmente dos grandes grupos que corresponden a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

## 2.4 Conclusiones

1. Se obtuvo la colección mas grande obtenida a la fecha del género *Colletotrichum* aislado de frutos con antracnosis en aguacate en México constituida de 300 aislados monospóricos.
2. La identificación cultural, morfológica y morfométrica basada en 18 variables permitió identificar a *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* como agentes causales de la antracnosis en frutos de aguacate en México.
3. Las tres técnicas de preservación a largo plazo del genero *Colletotrichum* aislado de frutos con antracnosis en aguacate en México resultaron en 100% de viabilidad.
4. El 83% de los aislados obtenidos de aguacate de los principales estados productores de México producen conidios unicelulares, hialinos, con extremos redondeados, el 11% se presentó conidios con un extremo redondeados y el otro agudo ambos tipos de conidios típicos de *Colletotrichum gloeosporioides*. El 6% de los aislados produce conidios con ambos extremos agudos típicos de *C. acutatum*.
5. La variación observada y condensada mediante un análisis multivariado permite ubicar dos grandes grupos, que corresponden a las dos especies identificadas como agentes causales de antracnosis en aguacate en este estudio, y nos ofrece indicios de que estas son especies complejo al incluir cinco subgrupos en total.



# Anexo A. Caracterización multivariada de 300 aislados monospóricos de *Colletotrichum* obtenidos de frutos con antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México.

Identificación	País	Región	Estado	Municipio	Localidad	Fecha	Material	Identificación	País	Región	Estado	Municipio	Localidad	Fecha	Material	Identificación	País	Región	Estado	Municipio	Localidad	Fecha	Material	Identificación	País	Región	Estado	Municipio	Localidad	Fecha	Material	Identificación	País	Región	Estado	Municipio	Localidad	Fecha	Material
1	México	Centro	Veracruz	Minatitlán	San Mateo	2010	Fruto	1	México	Centro	Veracruz	Minatitlán	San Mateo	2010	Fruto	1	México	Centro	Veracruz	Minatitlán	San Mateo	2010	Fruto	1	México	Centro	Veracruz	Minatitlán	San Mateo	2010	Fruto	1	México	Centro	Veracruz	Minatitlán	San Mateo	2010	Fruto

## 2.5 Literatura citada

- Adaskaveg, J.E. and Hartin, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87: 979-987.
- Agostini, J.P., Timmer, B. and Mitchell, C. 1992. Morphological, and pathological characteristics on *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82: 1377-1382.
- Álvarez, E., Gañán, L., Rojas-Triviño, A., Mejía, F. J., Llano, G. and González, A. 2014. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *Eur J Plant Pathol* 139: 319–332.
- Andrades, I., Yender, F., and Labarc, J. 2009. Evaluation of anthracnose (*Colletotrichum* sp.) in *Annona muricata* L. Giant type in the sector Moralito, Zulia State, Venezuela. *Revista UDO A 148 Agricola* 9 (1): 148-157.
- Arx, J.A. von. 1970. A revision of the Fungi classified as *Gloesporium*. 2nd edn. J. Cramer, Vaduz, Leichtenstein: 203p.
- Bailey, J.A. and Jeger, M.J. 1992. *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. Wallingford UK : CAB International. 387p.
- Bailey, J.A, O'Connell, R.J., Pring, R.J. and Nash, C. 1992. Infected Strategies of *Colletotrichum* Species. En: *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. Bayley. J.A and Jeger, M J, British Society for Plant Pathology. UK. 88-120.
- Bailey, J. A., Nash. C., Morgan, L. W., O'Connell, R. J. and TeBeest, D. O. 1996. Molecular Taxonomy of *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose on the Malvaceae. *Molecular Plant Pathology* 86: 1076 – 1083.
- Barquero, Q.M., Peres, A.N., y Arauz L.F. 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y

*Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense* 37(1): 23-38.

Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA: 218 p.

Binyamini, N, Schiffmann-Nadel, M. 1972. The utilization in vitro of different avocado fruit constituents by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycologia*. Jul-Aug 64(4): 916-9.

Botero, M. J. 2001. Interacción biológica de microorganismos relacionados con *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc., agente causal de la Antracnosis en tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). *Manizales*. 184p. Tesis de Magíster en Fitopatología. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Botero, M.J., Franco, G, Castaño-Zapata, J. y Ramírez, M.C. 2003. Enfermedades de poscosecha en lulo (*Solanum quitoense*), mora (*Rubus glaucus*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*). p. 59. En: XXIV Congreso Nacional de Fitopatología (2003: Armenia. Colombia). *Memorias*. Armenia: Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines.

Catalogue of life 2014. Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree>.  
Revisado el 13 de diciembre de 2014.

Chowdappa, P., Somashekar, Ch.Ch., Harghavi, R., Sandhya, H. and Prasad, P.R. 2012. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. isolates causing anthracnose of orchids in India. *Biotechnology Bioinformation Bioengineer*. 2: 567-572.

Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., Weir, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G. and Crous, P.W. 2012. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in*

Mycology 73: 1–36.

- Domínguez-Guerrero, I.P., Mohali-Castillo, S.R., Marin-Montoya, M.A. y Pino-Menesini, H.B. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology*: 37 (2): 108-122.
- Dórea B.C.A. 2013. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. Associated with fruits in Brazil. University of Sao Paulo “Luiz de Queiroz” College of Aquiculture. Thesis presented to obtain the degree of Doctor of Science. Area: Plant Pathology. Pp. 69.
- Denoyes, B. and Baudry, A. 1995. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology* 85: 53-57.
- Echandi, E. 1971. Obtención de cultivos monospóricos por los métodos de dilución y rayado. En: *Manual de laboratorio para fitopatología general*. Furrialva. Editorial Hnos. Restrepo.
- FAO 2013. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/es/>
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82(6): 596-604.
- Gutiérrez, O.A., Nieto, D.A., Gutiérrez, J.G.A., Delgadillo, F.S., y Domínguez, J.L.A. 2002. Características Morfológicas, Culturales y Patogenicidad de Aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de Frutos de Guayaba (*Psidium guajava* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1):
- Gunawardhana, P.L.T., Senevirathna, A.M.W.K., Adikaram, N.K.B., and Yakandawala, D.M.D. 2009. A phenetic analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from selected host plants. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, Sri Lanka, 38 (2): 57-

66.

- Hyde, K.D., Cai, L, Cannon, P.F, Crouch, J.A., Crous, P.W. 2009. *Colletotrichum* –names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147–182.
- Jacson, M. and Bothas T.R. 1990. Carbon concentration and carbon to nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL 13777 *Environmental Microbiology*. 58(7):31-38.
- Jacson, M. and Schister D. 1992. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by nutritional. *Environmental Microbiology* 56(11): 260-265.
- Jacson, M. and Slinger, P. 1993. Submerged culture conidial germination and conidiation of bioherbicide *Colletotrichum truncatum* are influenced by the aminoacid composition of the medium. *Journal of Industrial Microbiology* 12: 417-422.
- Johnston, P.R. and Jones, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89: 420–430.
- Johnston, P.R., Pennycook, S.R. and Manning, M.A. 2005. Taxonomy of fruit-rotting fungal pathogens: what is really out there?. *New Zealand Plant Protection* 58:42-46
- Kirk P. M, Cannon P. F, David J. C, and Stalpers J.A. 2001. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9th edn. CABI, Egham, UK.
- Lardner R, Johnston PR, Plummer KM, Pearson MN 1999. Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. *Mycological Research* 103: 275–285.
- Montero, T.V., Morales, G.J.L., González, C.M.M., Anaya, L.J.L., Corona, T.T. y Gálvez, M.A. 2010. Genetic, pathogenic and morphological diversity of fungi *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) from Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(2): 159-174
- Mordue, J.E.M. 1971. *Glomerella cingulata*. C.M.I. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria.

315: 2 pp.

Morales, G.J.L., Azfiroz R.H.S y Pedraza, S.M.E. 2009. Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis en aguacate (*Persea americana* Mill) en Michoacán, México. Revista UDO Agrícola 9 (4): 848-856.

Muñoz C., Gómez L., Umaña G. 2003. Caracterización morfológica y bioquímica de aislados de *Colletotrichum* spp y su patogenicidad en mango (*Mangifera indica* L.). Tecnología en Marcha. Vol. 16 N° 1.

Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, K., and Trapero, A. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp causantes de la antracnosis del olivo. Bol. San. Veg. Plagas 31: 531-548.

Pérez, C.L.M., José, S.M., Beltrán, H.J.D. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. Revista Colombiana de Biotecnología <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/589>

Rojas, E.I., Rehner, S.A., Samuels, G.J., Van Bael, S.A., and Herre, E.A. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. Mycologia 102: 1318-1338.

Saldarriaga, C.A., Castaño, Z.J. y Arango I. R. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol manzano y mora. Rev. Acad. Colomb. XXXII (123): 145-156.

Silva-Rojas, H.V. and Avila-Quezada, G.D. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. Plant

Pathology 60: 899–908.

- Silva, D.N., Talhinhos, P., Cai, L., Manuel, L., Gichuru, E.K., Loureiro, A., Várzea, V., Paulo, O.S., Batista, D. 2012. Host-jump drives rapid and recent ecological speciation of the emergent fungal pathogen *Colletotrichum kahawae*. *Molecular Ecology* 21: 2655–2670.
- 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*. Commonwealth Mycological Institute, Kew Surrey, England, 696p.
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant disease* 74: 69-76.
- Tamayo, M.P.J. 2007. Enfermedades del Aguacate. Politécnica No. 4. Medellín Colombia: 51-70.
- Villanueva-Arce, R., Yáñez-Morales, M.J. y Hernández-Anguiano, A.M. 2008. Especies de *Colletotrichum* en Chirimolla (*Annona cherimola* Mill.) *Agrociencia* 42: 689-701.
- Vinnere, O. 2004. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study on two extreme cases. UppsalaSweden. 42h. Thesis Doctor of Philosophy. Uppsala University.
- Walker, J., Nikandrow, A., and Millar, G.D. 1991. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in *Colletotrichum*. *Mycological Res.* 95: 1175-1193.
- Weir, B.S. and Johnston, P.R. 2009. Defining and delimiting genetic species in *Colletotrichum*. Asian Mycological Congress 2009. Taichung Taiwan November 15–19: 0-128.
- Wharton, P.S. and Diéguez-Uribeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. En: *Anuales del Jardín Botánico de Madrid* 61(1): 3-22.

Wheeler, H.E. 1956. Sexual versus asexual reproduction in *Glomerella*. *Mycologia* 48: 349-353.

Živković S., Saša, S., Žarko, I., Nenad, T., Nenad, D., Goran, A., and Jelica B. 2010.

Morphological and Molecular Identification of *Colletotrichum acutatum* from Tomato Fruit. *Pestic. Phytomed* 25(3) 231–239.



### **Capítulo III. Pruebas de virulencia y patogenicidad cruzada de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México**

Leticia Robles-Yerena<sup>1</sup>, Daniel Nieto-Ángel<sup>1</sup>, Daniel Téliz-Ortiz<sup>1</sup>, J. Concepción Rodríguez Maciel<sup>2</sup>, Dr. Mario Orozco Santos<sup>3</sup>, Cristian Nava-Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230. <sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad-Entomología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230 <sup>3</sup>INIFAP – Campo Experimental Tecoman. Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecoman, Colima, México: 28930.  
[lrobles@colpos.mx](mailto:lrobles@colpos.mx)

#### **Resumen**

La patogenicidad y virulencia cruzada de 300 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. aislados de frutos de aguacate (cv Hass y Fuerte) de las principales zonas productoras a nivel nacional fue determinada. La patogenicidad y virulencia cruzada se evaluó al inocular discos de micelio de 0.5 cm de la colonia del patógeno sobre frutos de aguacate cv “Hass”, cv “Fuerte”, plátano cv “Cavendish” y mango cv “Manila”, con y sin herida. Los 300 aislados fueron patógenos en aguacate. Catorce aislados no lograron infectar mango y cuatro no indujeron enfermedad en frutos de plátano. El 94% de los aislados puede afectar a mango y plátano en un fenómeno conocido como patogenicidad cruzada. Los aislados fueron más virulentos en el hospedante original (hasta 43mm de lesión) que en los hospedantes alternos (hasta 31mm de lesión). Se observó que cuando se provoca una herida se facilita la entrada del patógeno y la infección se ve reflejada en un mayor diámetro de lesión (hasta 43mm) y cuando no se realiza la herida el diámetro de la lesión es menor (hasta 36mm).

**Palabras clave:** patogenicidad, virulencia, *Colletotrichum*, aguacate, mango, plátano

### **Chapter III. Test of pathogenicity and virulence of *Colletotrichum* spp. isolated from avocado fruits in Mexico**

#### **Abstract**

The pathogenicity and virulence of 300 single-spore cultures of *Colletotrichum* spp. isolated from avocado fruits (cv Hass and Fuerte) of the main producing areas nationwide were determined. Pathogenicity and virulence were evaluated by inoculating 0.5cm mycelial discs on avocado fruits cv "Hass" cv "Fuerte", banana cv "Cavendish" and mango cv "Manila", with and without injury. The 300 isolates were pathogenic on avocado. Fourteen single-spore cultures failed to infect mango and four did not induce disease in banana fruits. Ninety-four percent of the isolates can affect mango and banana in a phenomenon known as cross pathogenicity. The 300 isolates were more virulent in the original host (lesion up to 43mm) than in alternate hosts (lesion up to 31mm). It was observed that wound facilitated the entry of the pathogen producing a larger diameter of lesion (up to 43mm) than when inoculation was on no-wounded fruits where the lesion diameter is smaller (up to 36mm).

**Key words:** pathogenicity, virulence, *Colletotrichum*, avocado, mango, banana

### 3.1 Introducción

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es la cuarta fruta tropical más importante en el mundo. Se estima una producción global de 2.6 millones de toneladas, siendo México el principal país productor con 1.2 millones de toneladas, seguido por Indonesia con 263,000 ton y Estados Unidos de Norteamérica con 214,000 ton (FAO, 2009).

Se ha observado una tendencia creciente en cuanto a superficie cultivada y volúmen de producción de este frutal. En 2010, se reportó una superficie de 122,348 hectáreas plantadas, de las cuales más del 90% contenían a la variedad Hass por su gran demanda a nivel mundial (Naamani, 2007). El estado de Michoacán ocupa el primer lugar en cuanto a producción con 1 millón de toneladas (90% del total), seguido por Nayarit con 26,000 ton (2.5%), Morelos con 25,000 ton (2.2%) y México con 21,000 ton (2%) (SIAP, 2010).

En México, el 69% de la producción se destina al consumo en fresco, 19% para la industria y 12% a exportación. Se reporta un consumo percapita anual de 10 kg, que ubica al país como el de mayor consumo de esta fruta (BANCOMEXT, 2010).

El fruto de aguacate tiene un elevado valor nutritivo: 100 g de pulpa contienen calorías (150 a 300 cal), hidratos de carbono (2.9 a 7.6 g), proteínas (1.2 a 2.1 g), grasa (6.1 a 21.2 g), agua (68 a 86 g) y fibra (0.7 a 2.1 g). Además de vitaminas A, D, E, K, B1, B2, B6, niacina, ácido pantoténico, biotina, ácido fólico y vitamina C. Minerales como calcio, hierro, fósforo, sodio, potasio, magnesio, manganeso, cobre, azufre y cloro (Bergh, 1992; Frias, 1994; Maldonado-Torres *et al.*, 2007), lo que permite afirmar que se ubica entre las frutas más completas, convirtiéndose en una alternativa de importancia para contrarrestar problemas de nutrición que actualmente se tienen, sobre todo, en zonas rurales.

Desafortunadamente la producción de aguacate en México y en el mundo se ve afectada por la antracnosis (*Colletotrichum* sp.), provocando pérdidas de hasta el 50% en las mayoría de las plantaciones comerciales (Teliz, 2000; Teliz y Mora 2007; Aráuz, 1995). Los síntomas típicos son manchas de colores oscuros con lesiones ligeramente hundidas en la superficie de los frutos (Agrios, 2005).

*Colletotrichum* spp. puede parasitar solanáceas (tabaco, chile, papa) (Nitzan *et al.* 2010; Than *et al.* 2008), leguminosas (alfalfa, chícharo, soya, frijol, haba) (Bhadauria *et al.* 2013; Rodríguez-Guerra *et al.* 2006), gramíneas (sorgo, avena, caña de azúcar, maíz, pastos) (Anne y Tomaso, 2012; Cannon *et al.* 2012; Costa da *et al.* 2005; Leyva-Mir *et al.* 2004; Singh 2008), orquídeas (Chowdappa *et al.* 2012), malváceas (algodón, kenaf, okra, café) (Bailey *et al.* 1996; Chen y Rodríguez, 2005), lauráceas (aguacate) (Montero *et al.* 2010; Barquero *et al.* 2013), anacardiáceas (mango) (Dodd *et al.* 1992), musáceas (plátano) (Peres *et al.* 2002), caricáceas (papaya) (Dodd *et al.* 1992), rutáceas (limón, naranja, lima) (Agostini *et al.* 1992; Brown *et al.* 1996), rosáceas (fresa, durazno, almendro, manzana) (Adaskaveg y Hartin 1997; Crusius *et al.* 2002; Sreenivasaprasad *et al.* 1992), mirtáceas (guayaba) (Gutiérrez-Alonso *et al.* 2002), anonáceas (guanábana, chirimoya) (McMillan, 1986), rubiáceas (café) (Cannon *et al.* 2012; Chen *et al.* 2006) y oleáceas (olivo) (Talhinhas *et al.* 2005).

Un hospedante puede ser parasitado por múltiples especies de *Colletotrichum* y múltiples hospedantes pueden ser infectados por una sola especie de este patógeno (Phoulivong *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012). Por ejemplo, la fresa puede ser afectada por *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Ureña-Padilla *et al.* 2002; Xiao *et al.* 2004) y estas especies tiene un amplio rango de hospedantes (Waller *et al.* 1993). En este sentido, el género *Colletotrichum* es un patógeno muy complejo debido a su variabilidad en morfología, rango de hospederos, patogenicidad y fisiología (Brooker *et al.*, 1991). El

género *Colletotrichum* incluye cerca de 500 especies. Von Arx (citado por Bonde *et al.* 1991), distinguió 594 sinónimos del grupo *C. gloeosporioides*. Dentro de este grupo hay varias formas patogénicas que se diferencian en base a la especificidad del hospedero. El potencial de infección cruzada ha sido reportado entre diferentes especies de *Colletotrichum* y genotipos de *C. gloeosporioides* y de sobre una gran variedad de frutas tropicales, subtropicales y templadas bajo condiciones artificiales de inoculación. Se ha demostrado que aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* son capaces de infectar manzana, nuez y durazno (Bernstein *et al.*, 1995), en estudios realizados en Israel se demostró que la antracnosis causada en aguacate por subespecies de *C. gloeosporioides* es la misma que causa la antracnosis en almendro, aun cuando los surcos de almendro se encontraban sembrados a lo largo de las plantaciones de aguacate.

Feeman *et al.*, (1998) mostro que *C. gloeosporioides* aislado de almendro manzana, aguacate y mango, asi como aislamientos de *C. acutatum* aislado de anemona, manzana y durazno, infectan frutos de otros hospederos incluyendo manzano, aguacate, almendro, mango y nectarina. Esto demuestrara el potencial de infección cruzada entre ambas especies.

En México no existe ningun trabajo que explore la patogenicidad cruzada y la virulencia de aislados obtenidos de aguacate. Esta información podría ayudar a identificar con mayor actividad a las especies involucradas así como contribuir a la determinación de razas patogénicas y auxiliar en el manejo de la enfermedad. Es por ello que el objetivo del trabajo fue estudiar la patogenicidad y virulencia de la colección más grande del género *Colletotrichum* obtenida de frutos de aguacate con el síntoma de antracnosis colectados de los principales estados productores de México.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Aislados**

Se utilizó la colección del género *Colletotrichum* aislado de frutos con antracnosis en aguacate en México constituida de 300 aislados monospóricos. De acuerdo a la caracterización morfológica y cultural, en esta colección se identificaron dos especies (*Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum*); sin embargo, se sospecha que puede haber hasta cinco diferentes especies.

### **3.2.2 Inóculo**

Los aislados monospóricos fueron sembrados en cajas Petri que contenían medio de cultivo Papa Dextrosa Agar. Las cajas fueron incubadas a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , con fotoperiodo de 12:12 durante 12 días, cuando el micelio había cubierto la totalidad de la superficie del medio.

### **3.2.3 Inoculación**

Con la finalidad de evaluar la capacidad de inducir enfermedad (patogenicidad) y el grado con el que los síntomas se presentan (virulencia), los 300 aislados fueron inoculados en frutos de aguacate (*Persea americana* Mill), mango (*Mangifera indica* L.) y plátano (*Musa cavendishii*). Testigos fueron incluidos como fuente de comparación.

Frutos libres de síntomas de antracnosis de aguacate, mango y plátano fueron lavados con agua corriente, posteriormente desinfectados en hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos y enjuagados dos

veces en agua purificada. Los frutos enjuagados se dejaron escurrir y secar durante 15 minutos. Posteriormente fueron seleccionados de acuerdo a su grado de madurez fisiológica de tal manera que todos los frutos dentro del experimento tuvieran el mismo grado de madurez y no presentaran síntomas de antracnosis. Los frutos fueron, etiquetados y colocados en charolas de unicel de 15 x 10cm las que contenían sanitas y agua destilada estéril. Dos de estas charolas fueron colocadas sobre un recipiente de 40x25 cm. Los frutos fueron inoculados con dos discos de medio de cultivo de 5mm de diámetro que contenía micelio del cultivo monospórico. Uno de los discos se colocó sobre tejido intacto y el otro sobre una herida realizada con una aguja de disección a una profundidad de 3 mm. Las charolas que contenían a los frutos inoculados se colocaron dentro de bolsas de polietileno transparente de 50 x 70cm que fueron selladas para proporcionar humedad relativa de 100%. Las charolas fueron incubadas a temperatura de 25°C y fotoperiodo de 12:12 durante siete días (Figura 1).



**Figura 1.** Inoculación de 300 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* aislados de aguacate de los principales estados productores de México. Inoculación frutos de aguacate con y sin herida con discos de medio de cultivo con crecimiento fungoso (A), frutos en charolas de unicel dentro de bolsa de polietileno (B), incubación a 25°C durante siete días (C) y medición del diámetro de la lesión con ayuda de un vernier digital (D).

### 3.2.4 Reaislamiento

1) Fragmentos de tejido con la zona de avance de las lesiones en frutos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% durante 1min, lavados dos veces en agua destilada estéril y secados en papel sanita estéril durante 15 minutos. Una vez secos, se colocaron cinco fragmentos en cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA (Bioxon, PDA, 39g $L^{-1}$  de agua).

2) Los frutos colectados fueron incubados hasta 15 días en el laboratorio hasta observar la esporulación del hongo en la lesión. Con una aguja de disección flameada, se tomó una muestra de las esporas que fue suspendida en 10ml de agua destilada estéril y 1ml de esta suspensión fue dispersada sobre el medio de cultivo PDA en una caja Petri con ayuda de un triángulo de vidrio (Echandi, 1971).

Las cajas Petri fueron selladas con Parafilm (Sigma-Aldrich) para evitar contaminación y se incubaron a  $23 \pm 1^{\circ}C$  con luz natural durante 10 días. Tanto las características MACRO (1 diámetro de crecimiento de la colonia; 2 color de la colonia: 1= blanco, 2= salmón, 3= gris, 4=café y 5= oscuro; 3 tipo de micelio: 1= aéreo, 2= plano; 4 densidad de micelio: 3= denso, 4= escaso; 5 anillos concéntricos de crecimiento: 1= presentes, 2= ausentes; 6 margen de la colonia: 1= bordes ondulados 2= bordes lisos; 7 esporulación: 1= presente, 2= ausente) como MICRO (8 tipo de micelio:1= sin septas evidentes, 2= con septas evidentes, 3=con y sin septas; 9 setas: 1= presente, 2= ausente; 10 ascosporas: 1= presente, 2= ausente; 11 clamidosporas: 1= presente, 2= ausente; 12 tipo de conidios: 1=extremos redondeados, 2= un extremo redondeados y otro agudo, 3=extremos agudos; 13 largo mínimo; 14 largo promedio; 15 largo máximo; 16 ancho mínimo; 17 ancho promedio; 18 ancho máximo de cincuenta conidios) fueron comparadas con las inicialmente observadas para cada monospórico.



### **3.2.5 Variables evaluadas y diseño experimental.**

Para evaluar la patogenicidad se determinó la presencia o ausencia de manchas necróticas circulares hundidas mientras que para evaluar la virulencia se cuantificó del tamaño de la lesión cada 48 horas con ayuda de un vernier digital (Figura 1).

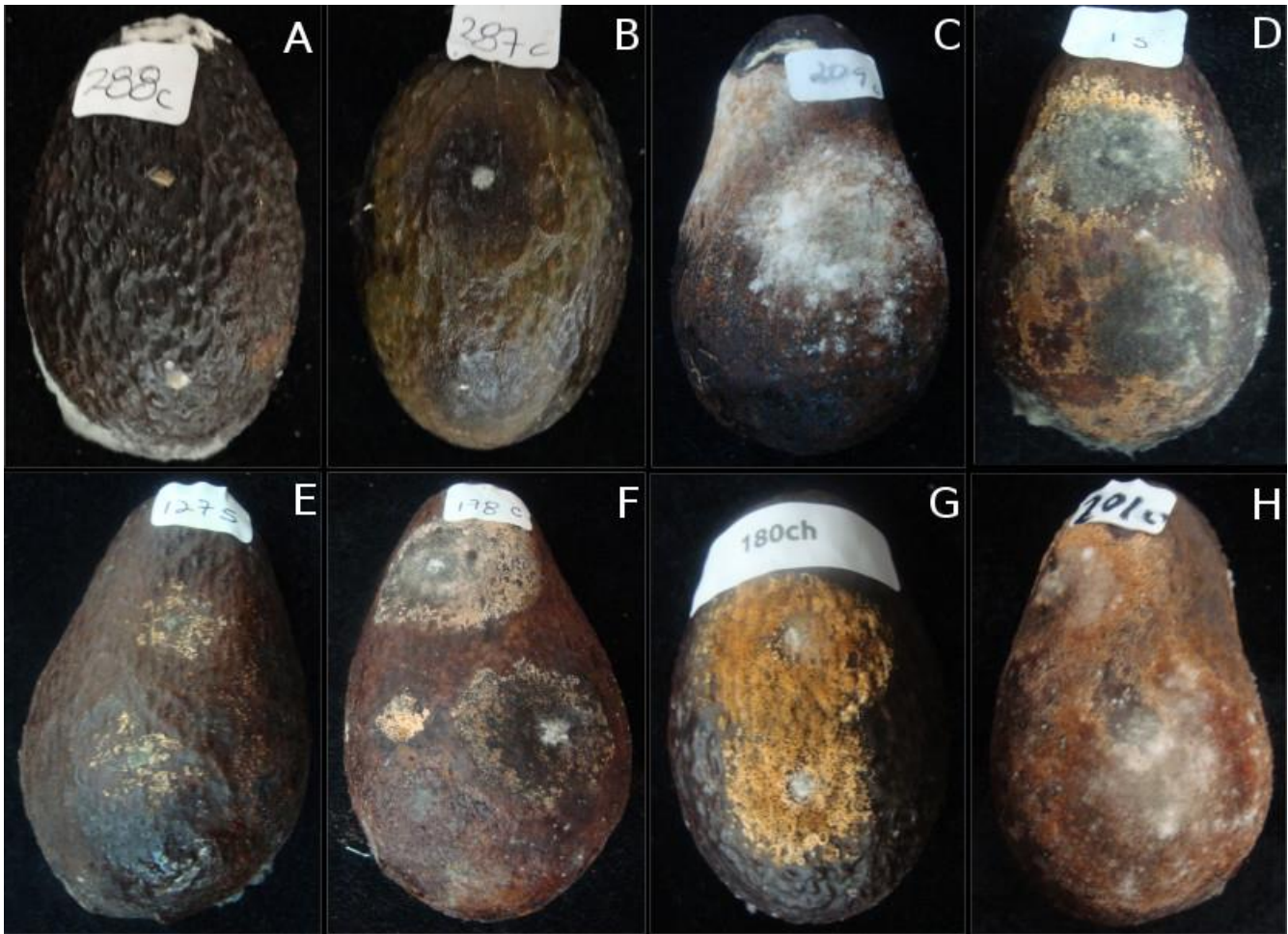
Los tratamientos (combinación de monospórico, método de inoculación y hospedante) se establecieron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

## **3.3 Resultados y discusión**

### **3.3.1 Patogenicidad**

Respecto a la capacidad de inducir enfermedad (patogenicidad) se observó que los 300 aislados de *Colletotrichum* spp. lograron infectar los frutos de aguacate cultivar Hass y Fuerte que tenían o no lesión previa a la inoculación. Siete días después de la inoculación (ddi), los frutos presentaron manchas circulares de color marrón claro en la epidermis de los frutos de aguacate. Las lesiones estaban ligeramente hundidas, con aspecto húmedo y consistencia blanda. A medida que la infección progresa, las lesiones se tornaron color marrón oscuro con hundimiento del tejido y presencia de masas de conidios de color naranja y marrón y micelio blanco-grisáceo (Figura 2). El hecho de que en nuestro experimento los trescientos cultivos monospóricos fueran capaces de inducir enfermedad con o sin herida previa nos permite afirmar que las cepas de *Colletotrichum* probadas tienen la capacidad de penetrar directamente o por medio de heridas resultando en una infección, subsecuente presencia del síntoma de antracnosis y destrucción de la producción. Los síntomas observados coinciden con lo

reportado por Prusky *et al.* (2001) y Domínguez-Guerrero *et al.* (2012).



**Figura 2.** Síntomas observados en frutos de aguacate cultivar Hass después de haber sido inoculados con 300 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* aislados de aguacate de los principales estados productores de México. Síntomas iniciales de antracnosis (A,B), síntomas de antracnosis con presencia de micelio (C), Presencia de conidios producidos directamente de la lesión en los puntos de inoculación (D-H).

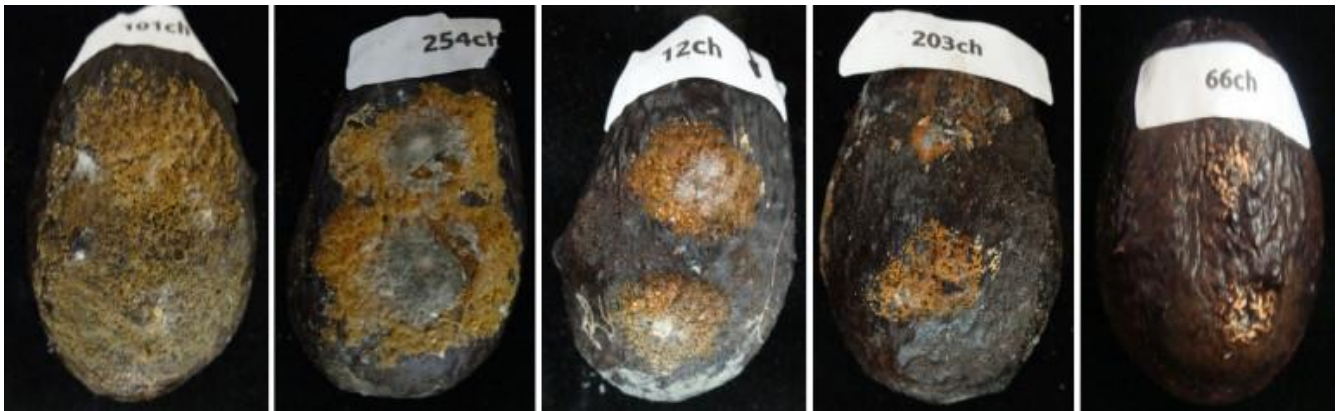
De secciones de tejido con síntomas de antracnosis o directamente de la esporulación observada dentro de la lesión, se reaisló al hongo inoculado en los frutos de aguacate. Tanto las características MACRO como MICRO de estos re-aislados coincidieron con las inicialmente observadas para cada monospórico inoculado, con lo cual se cubre cabalmente con el 4º postulado de Koch.

Respecto a la capacidad de inducir enfermedad en otros cultivos (Patogenicidad cruzada) se observó que no todos los cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de aguacate lograron infectar los frutos de mango cultivar Manila y plátano cultivar Cavendish que tenían o no lesión previa a la inoculación. Catorce cultivos monospóricos de *Colletotrichum* aislados de aguacate no lograron infectar mango y cuatro monospóricos no lograron establecerse en frutos de plátano. Nuestras observaciones coinciden con lo reportado por Contreras (2006) quien demostró el potencial de infección cruzada al inocular 12 aislados de frutos de granadilla, lulo, mango, tomate de árbol y tallos de mora sobre diferentes hospederos utilizando bloques de agar y suspensiones conidiales ajustadas a  $1 \times 10^5$  conidia/ml sobre frutos y tallos con y sin herida. Martínez *et al.* (2009) observaron que *Colletotrichum acutatum* aislado de limón, induce síntomas en lima y tomate de árbol, pero sólo un bajo porcentaje fue patógeno en mango. Feerman *et al.*, (1998) menciona que *C. gloeosporioides* aislado de almendro, manzana, aguacate y mango y *C. acutatum* aislado de anemona, manzana y durazno infectan frutos de otros hospederos (manzano, aguacate, almendro, mango y nectarina).

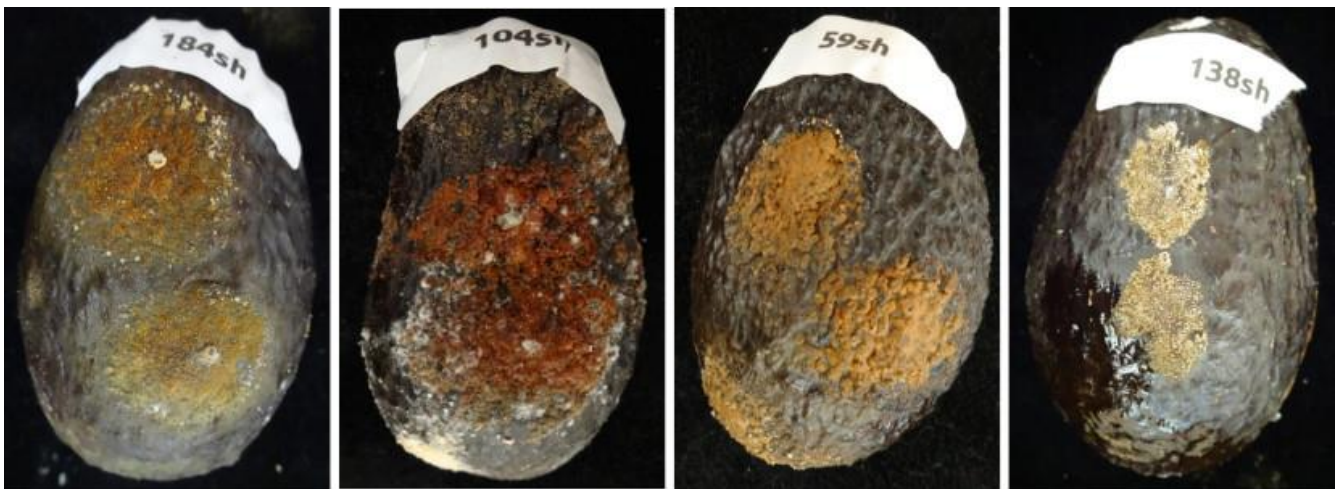
### 3.3.2 Virulencia

Se obtuvieron 167 cultivos monospóricos de síntomas de antracnosis de aguacate cultivar Hass de los principales estados productores de México. Al ser inoculados en frutos del mismo cultivar previamente heridos (Figura 3) se observó que los aislados que producían lesiones con mayor diámetro eran: MexVillaGro162 (43mm), MichUru5 (42mm), NayXalis115(41mm), MichUru8 (41mm), MexVillaA182 (41mm), MichPer18 (40mm), MichTanc40 (40mm) y los que menor diámetro de lesión fueron MexVillaA185 (12mm), PueZacapal205 (11mm), MichTanc32 (10mm), JalTux268 (10mm), MorZacual106 (8mm), MichArio13 (7mm). Estos resultados nos indican que *Colletotrichum* aislado de cultivar Hass tiene la capacidad de infectar al fruto de aguacate a través de heridas. Por otro lado, al ser

inoculado en frutos de aguacate sin herida (Figura 4) se puede evaluar la capacidad inata del hongo para inducir enfermedad. En esta caso se observó que el grupo más virulento estuvo conformado por los aislados: MexCoateH152 (36mm), NayTepic134 (34mm), NayTepic131 (33mm), MichPer18 (32mm), MichTanc42 (32mm) y los que menor diámetro de lesión fueron: MorZacual110 (3mm), MorTotola96 (3mm), MexVillaA181 (3mm), MorTetela76 (4mm).

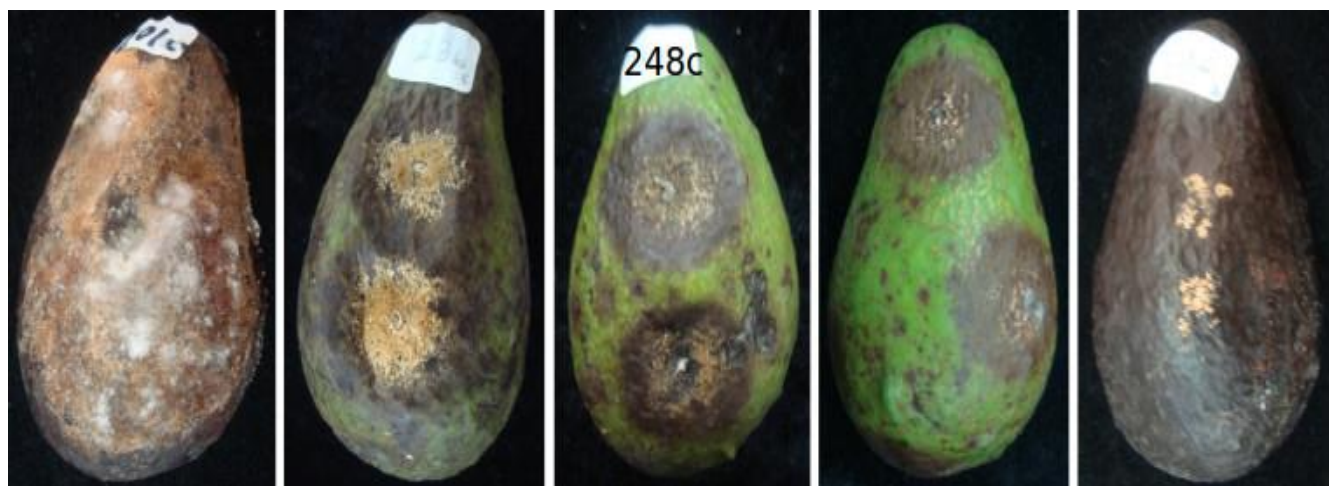


**Figura 3.** Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos en frutos de aguacate cultivar Hass previamente heridos. Note el tamaño de las lesiones de antracnosis y la copiosa esporulación resultado de la facilitación del proceso de infección por medio de la herida.



**Figura 4.** Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos en frutos de aguacate cultivar Hass sin herida. Note el tamaño de las lesiones de antracnosis y la esporulación.

Se obtuvieron 133 cultivos monóspóricos de síntomas de antracnosis en aguacate cultivar Fuerte de los principales estados productores de México . Al ser inoculados en frutos del mismo cultivar previamente heridos (Figura 5) se observó que los aislados que producían lesiones con mayor diámetro eran: MorOcui61(42mm), MorYecapix79 (40mm), PueQuimix237 (40mm), PueTochimil248 (40mm) y los de menor diámetro de lesión fueron: PueAtlix194 (4mm), PueTochimil251 (12mm), PueQuimix240 (13mm), MexTenan168 (13mm), MexTenan165 (13mm). Estos resultados nos indican que *Colletotrichum* aislado de aguacate cultivar Fuerte tiene la capacidad de infectar al fruto a través de heridas. Por otro lado, al ser inoculados en frutos de aguacate sin herida (Figura 6) se puede evaluar la capacidad inata del hongo para inducir enfermedad. En esta caso se observó que el grupo más virulento estuvo conformado por los aislados: MorOcui62 (35mm), MorOcui61 (32mm), NayStaMa143 (30mm), NayIxtlan147 (28mm), MorYecapix87 (27mm) y los que menor diámetro de lesión fueron: PueTochimil254 (2mm), PueAtlix195 (2mm), MorOcui57 (2mm).



**Figura 5.** Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos en frutos de aguacate cultivar Fuerte previamente heridos. Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la copiosa esporulación resultado de la facilitación del proceso de infección por medio de la herida.



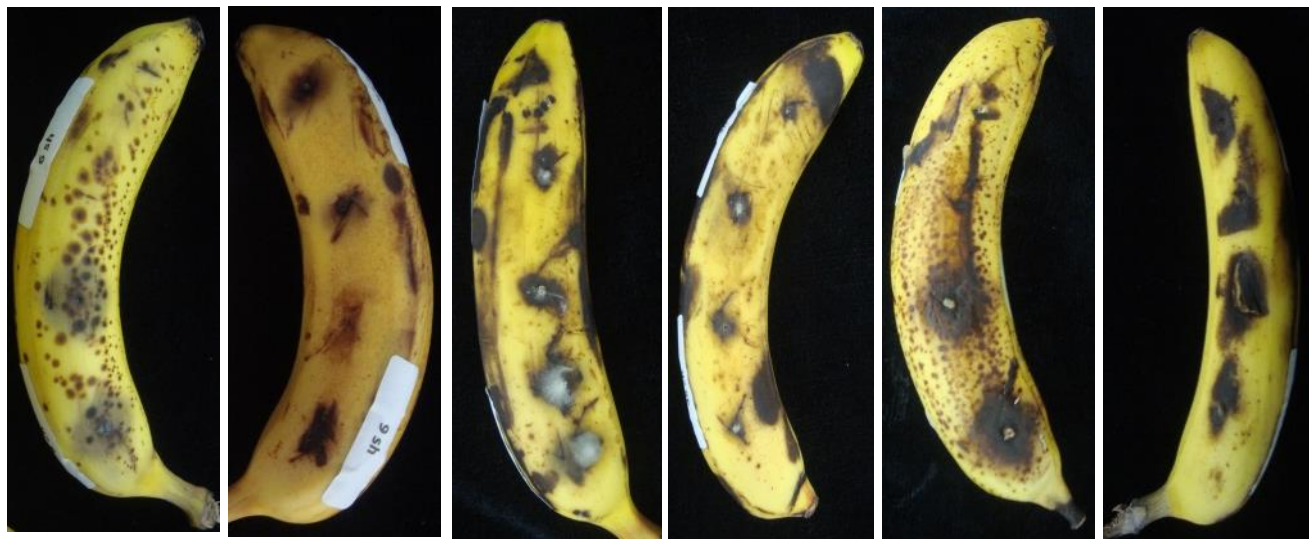
**Figura 6.** Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos en frutos de aguacate cultivar Fuerte sin herida. Note el tamaño de las lesiones de antracnosis y la esporulación.

La variación observada en el tamaño de la lesión cuando se inoculan frutos de aguacate cultivar Hass y Fuerte concuerda con lo descrito por Menezes (2002), quien menciona que *Colletotrichum* muestran una gran variabilidad en el mismo sustrato lo que puede ser evidencia de la presencia de diferentes especies o razas fisiológicas. Por otro lado, en nuestras observaciones puede notar que cuando se provoca una herida se facilita la entrada del patógeno y la infección se ve reflejada en un mayor diámetro de lesión y cuando no se realiza la herida el diámetro de la lesión es menor.

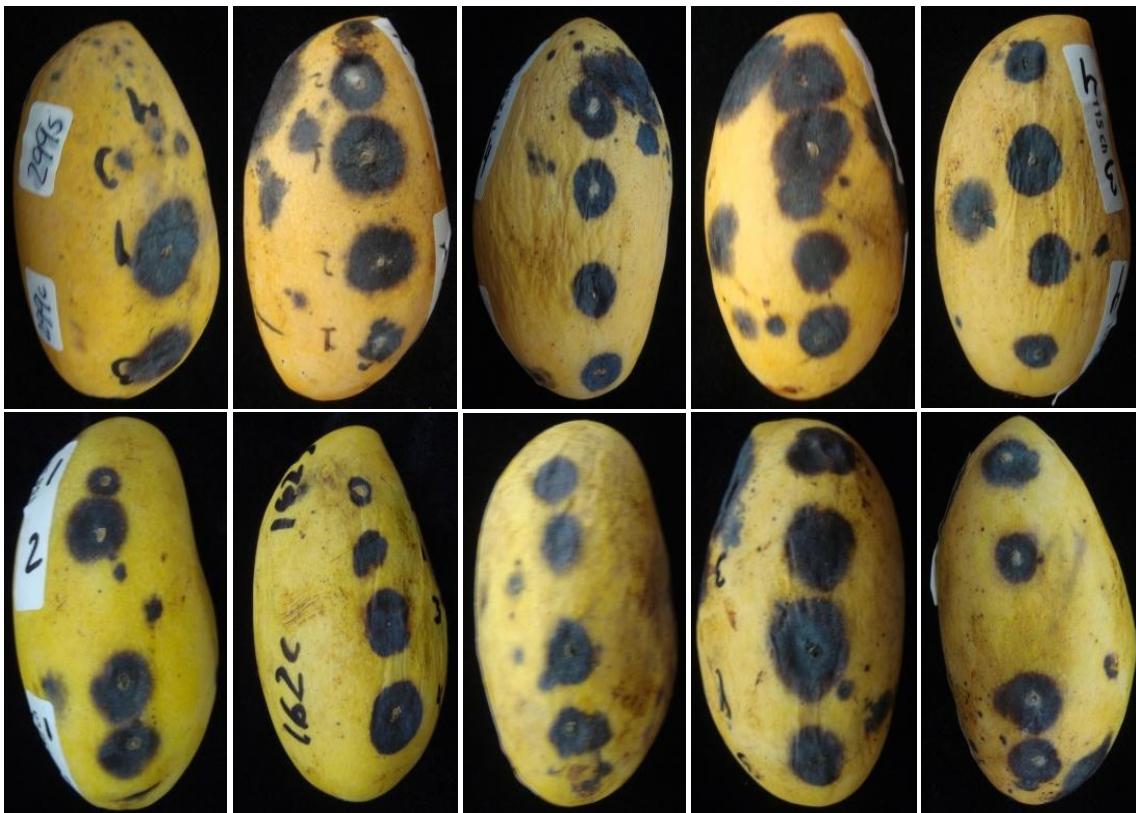
### 3.3.3 Virulencia cruzada

Al inocular los 300 cultivos monóspóricos en frutos de plátano y mango con y sin herida, se observó el mismo comportamiento que en frutos de aguacate: al provocar una herida se facilita la entrada del patógeno y la infección, lo cual se ve reflejado en un mayor diámetro de lesión y cuando no se realiza la herida el diámetro de la lesión es menor. En frutos de plátano (Figura 7) previamente heridos se observó que los aislados que producían lesiones con mayor diámetro eran: PueQuimix232 (43mm), JalSayula296 (36mm), MichUru6 (34mm) y JalSayula290 (32mm). En frutos de mango

(Figura 8) previamente heridos se observó que los aislados que producían lesiones con mayor diámetro eran: MexVillaGro162 (35mm), JalEscati302 (33mm), PueQuimix234 (32mm) y MichUru8 (32mm).



**Figura 7.** Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos aislados de aguacate e inoculados en frutos de plátano cultivar Cavendish con herida previa (región superior de los frutos) y sin herida previa (región inferior de los frutos). Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la esporulación en ambos tratamientos.



**Figura 8.** Variación en el tamaño de la lesión obtenida al inocular 300 cultivos monospóricos aislados de aguacate e inoculados en frutos de mango cultivar Manila con herida previa (región inferior de los frutos) y sin herida previa (región superior de los frutos). Notese el tamaño de las lesiones de antracnosis y la esporulación en ambos tratamientos.

De los 300 cultivos monóspóricos obtenidos de síntomas de antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México sobresale el aislamiento **MichUru5** obtenido de cultivar “Hass”. Este monóspóricos resultó ser de los mas virulentos cuando se provoca una herida previa. En frutos de aguacate cv Hass se ubicó en el tercer lugar (con diámetro de lesión de 42mm), en fruto de aguacate cv Fuerte se ubicó en el décimo quinto lugar (38mm), en fruto de plátano se ubicó en el sexto lugar (31mm) y por último en fruto de mango se ubicó en el octavo lugar (30mm).



También sobresale el aislamiento **MexCoateH152 (36.41 mm)** obtenido de cultivar “Hass” ya que cuando se inoculó sin herida previa en aguacate cv Hass se ubicó en el primer lugar, en aguacate cv Fuerte se ubicó en el lugar 196 (14mm), en plátano se ubicó en el lugar 203 (6 mm) y en mango se ubicó en el lugar 82 (10mm). Alahakoon *et al.* (1994) al inocular cepas de *C. gloeosporioides* obtenidas de frutos de mango, aguacate y guayaba en durian encontraron que inducen un diámetro de lesión menor al observado en el hospedante original, coincidiendo con nuestras observaciones.

De manera sobresaliente el cultivo monospórico **MichUru1** (aislado de Hass) inoculado en el fruto de aguacate cv “Hass” con herida, provoca un diámetro de lesión de 17mm, mientras que en el cv Fuerte induce 32mm, en plátano 20mm y en mango 9mm. Cuando este aislamiento se inoculó en frutos sin herida, en aguacate cv Hass provocó un diámetro de lesión de 9mm, en aguacate cv Fuerte 20mm, en plátano 15mm y en mango 8mm. Este cultivo monospórico resultó ser más virulento en el aguacate cv Fuerte con y sin herida, seguido de plátano y mango. Aguilar (2010) reporta algo muy similar al mencionar que aislados de aguacate y carambolo presentaron un mayor daño en frutos de plátano y papaya.

**MichUru8** (aislado de Hass), al ser inoculado con herida en aguacate cv Hass provocó un diámetro de 41mm, en mango 32mm, en plátano 27mm y en aguacate cv Fuerte indujo 22mm. Cuando se inoculó sin herida, en aguacate cv Fuerte provocó un diámetro de lesión de 15mm, en plátano 11mm, en aguacate cv Hass 9mm y en mango 0.00 mm. El valor obtenido en mango sin herida fue sorprendente pues cuando se inoculó con herida en el mismo cultivo resultó entre los diámetros de lesión más grandes. Pereira *et al.* (2010), Alahakoon *et al.* (1994), Freeman y Shabi (1996) aseguran que los aislados de *C. gloeosporioides* son más virulentos en su sede de origen. Este fenómeno sugiere la existencia de variantes. Según Jonsthorpe (2000), en la interacción variedad/patógeno, no se conoce

con claridad porque una especie ataca a un huésped y no a otro. Freeman *et al.* (2000) coinciden al mencionar que *Colletotrichum* presenta una gran variabilidad, la cual se expresa en diferenciales de patogenicidad y virulencia.

También se observaron aislados de aguacate cv “Fuerte” que resultaron muy virulentos en aguacate cv Hass cuando se realizó una herida previa: MexTenan166, MorOcui68, PueQuimix239, PueQuimix243, PueTochimil245, PueTochimil248, PueTochimil250, PueTochimil252, PueTochimil253, PueTochimil254, PueTochimil255 y JalTamaz262. Lo cual coincide con lo reportado por Gutierrez-Alonso *et al.*, 2003, al mencionar que la presencia de heridas en el fruto de mango indujo un mayor intensidad de enfermedad (>90%) que en frutos sin heridas (<27%). En contraparte, los aislados de aguacate cv Hass que resultaron virulentos en aguacate cv Fuerte son: MichArio12, NayTepic122, NayXalis114, PueZacapal201, PueZacapal206, PueZacapal207 y JalTamaz262.

La presencia de heridas aceleraron los procesos de maduración y senescencia del fruto, y en consecuencia la pérdida de la resistencia a la antracnosis (Gutierrez-Alonso *et al.*, 2003), Drobny *et al.* (1986 y 1987) mencionaron que compuestos como 5-12-cis heptadecenyl resorcinol, 5-pentadecenyl resorcinol y un resorcinol sustituido, que se encuentran en la epidermis del fruto inmaduro, están involucrados en la resistencia a *C. gloeosporioides*.

### 3.4 Conclusiones

1. Los 300 cultivos monospóricos obtenidos de aguacate (cv Hass y Fuerte) fueron patógenos en el mismo cultivo.
2. Catorce de estos cultivos monospóricos no lograron infectar mango (cv Manila) y cuatro monospóricos no lograron establecerse en frutos de plátano (cv Cavendish), con ello se constató

que la gran mayoría (94%) tienen el potencial de afectar a otros cultivos en un fenómeno conocido como patogenicidad cruzada, brindando ventajas en la sobrevivencia del hongo.

3. Los 300 aislados monospóricos obtenidos de aguacate (cv Hass y Fuerte) fueron mas virulentos en el hospedante original que en los hospedantes alternos.
4. Los aislados presentan una variación increíble en cuanto a virulencia, estimada como diámetro de lesión, que oscila de 2 a 43mm. Esto es indicio de la presencia de varias especies en la colección evaluada.
5. En general, cuando se provoca una herida se facilita la entrada del patógeno y la infección se ve reflejada en un mayor diámetro de lesión y cuando no se realiza la herida el diámetro de la lesión es menor.



### 3.5 Literatura citada

- Adaskaveg, J.E. and Hartin, R.J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87: 979-987.
- Agostini, J.P., Timmer, L.W. and Mitchell, D.J. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82: 1377-1382.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Department of Plant Pathology University of Florida. 922 p.
- Aguilar, P.L.A. 2010. Infección cruzada de especies de *Colletotrichum* en frutos tropicales en postcosecha. Tesis para obtener el grado de Maestro en ciencias. p. 83
- Alahakoon, P.W., Brown, A.E., and Sreenivasaprasad, S. 1994. Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44: 93-103.
- Anne, C.J. and Tomaso, P.M. 2012. Anthracnose disease of centipedegrass turf caused by *Colletotrichum eremochloae*, a new fungal species closely related to *Colletotrichum sublineola*. *Mycologia* 104: 1085-1096.
- Aráuz, L. F. 1995. Combate de Antracnosis en mango. Memoria 2do. Seminario Internacional del cultivo de mango. Puntarenas, Costa Rica. pp 56-70.
- BANCOMEXT. 2010. Banco Nacional de Comercio Exterior, S.N.C. <http://www.bancomext.com/Bancomext/secciones.html>. (Consulta el 9 de febrero del 2010).
- Bailey, J.A., Nash. C., Morgan, L.W., O'Connell, R.J. and TeBeest, D.O. 1996. Molecular Taxonomy of *Colletotrichum* Species Causing Anthracnose on the Malvaceae. *Molecular Plant Pathology* 86: 1076-1083.
- Barquero, Q.M., Peres, A.N. y Arauz, L.F. 2013. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho de hoja de cuero, limón criollo, papaya,

- carambola y mango en Costa Rica y Florida, Estados Unidos. *Agronomía Costarricense* 37: 23-38.
- Bergh, B. 1992. Nutritious value of avocado. *California Avocado Society Yearbook* 76: 123-135.
- Bemstein B., Zehr E. I., Dean R. A. and Shabi E. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts. *Plant Dis.* (79):478-482.
- Bhadoria, V., Bett, K.E., Zhou, T., Vandenberg, A., Wei, Y. and Banniza, S. 2013. Identification of *Lens culinaris* defense genes responsive to the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. *BMS Genetics* 14: 1-9.
- Bonde, M.R., Peterson, G.C., and Maas, G.L. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* spp. pathogenic to strawberry. *Phytopathology* 81: 1523-1528.
- Brooker, N.L., Leslie, J.F., and Dickman, M.B. 1991. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of Vegetative Compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology* 81(6): 672-677.
- Brown, A.E., Sreenivasaprasad, S. and Timmer, L.W. 1996. Molecular characterization of slow-growing orange, and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86: 523-527.
- Cannon P.F., Damm U., Johnston P.R., Weir B.S. 2012. *Colletotrichum*: current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73: 181-213.
- Chen, L.S., Chu, C., Liu, C.D., Chen, R.S. and Tsay, J.G. 2006. PCR-based Detection and Differentiation of Anthracnose Pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from Vegetable Soybean in Taiwan. *Journal of Phytopathology* 154: 654-662.
- Chen, Z.L.J. and Rodriguez, C.J. 2005. *Colletotrichum gloeosporioides* can overgrow *Colletotrichum kahawae* on green coffee berries first inoculated with *C. kahawae*. *Biotechnology Letters* 27: 679-68.

- Chowdappa, P., Somashekar, Ch.Ch., Harghavi, R., Sandhya, H. and Prasad, P.R. 2012. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. isolates causing anthracnose of orchids in India. *Biotechnology Bioinformation Bioengineering*. 2: 567-572.
- Contreras H.C.A. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislados de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Mango indica* L) y tallos de mora (*Rubus glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. Trabajo de grado. Microbiólogo Agrícola y Veterinario. p. 115.
- Costa da, R.V., Casela, C.R., Zambolim, L., Santos, G.F., Vale do, F.X.R. 2005. Evaluation of Genetic Mixtures of Sorghum Lines for Anthracnose Resistance Management. *Fitopatologia Brasileira* 30: 525-526.
- Crusius, L.U., Forcelini, C.A., Sanhueza, R.M.V. and Fernandes, J.M.C. 2002. Epidemiology of apple leaf spot. *Fitopatología Brasileira* 27: 065 – 070.
- Domínguez-Guerrero, I.P., Mohali-Castillo S.R, Marín-Montoya M.A. y Pino-Menesini H.B. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathology* 37(2):108-122.
- Dodd, J.C., Estrada, A., Jeger, M.J. 1992. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates in the tropics. In: Bailey, J. A., Jeger, M. J. (eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, U.K. CAB International. pp. 308-325.
- Droby, S., Prusky, D., Jacoby, B., and Goldman, A. 1986. Presence of an antifungal compound in the peel of mango fruits and their relation to latent infections of *Alternaria alternata*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 29:173. Droby, S., Prusky, D., Jacoby, B., and

- Goldman, A. 1987. Induction of antifungal resorcinols in flesh of unripe mango fruits and its relation to latent infection by *Alternaria Alternata*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 30:67.
- Echandi, E. 1971. Obtención de cultivos monospórico por los métodos de dilución y rayado. En: *Manual de laboratorio para fitopatología general*. Furrrialva. Editorial Hnos. Restrepo.
- FAO. 2009. Organización para la Alimentación y la Agricultura. <http://faostat.fao.org>. (Consulta el 15 de junio del 2010).
- Freeman, S., and Shabi, E. 1996. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various host. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49: 395-404.
- Freeman, S., Katan, T., and Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. *Plant Dis.* (82): 596-605.
- 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.
- Frias, H. 1994. Propiedades nutritivas del aguacate. Departamento de Nutrición de Guayal S.A. Buenos Aires, Argentina. 12 p.
- Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Angel, D., Gutiérrez-Alonso, J.G., Delgadillo-Sánchez, F. y Domínguez-Álvarez, J.L. 2002. Características Morfológicas, Culturales y Patogenicidad de Aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de Frutos de Guayaba (*Psidium guajava* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 24-30.
- Gutiérrez-Alonso, J.G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F., y Vaquera-Huerta, H. 2003. Resistencia a benomil y tiabendazol en aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en cinco regiones de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:260-266.



- Jonsthor, P.R. 2000. The importance of phylogeny in understanding host relationships within *Colletotrichum*. En: *Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. Eds. Dov Prusky, Stanley Freeman and Martin B. Dickman St Paul, Minnesota: ed. APS Press the American Phytopathological Society.
- Leyva-Mir, S.G., Soto, H.A., Espitia, R.E., Villaseñor, M.H.E., González, I.R.M., y Huerta, E.J. 2004. Etiología e Incidencia de la Antracnosis [*Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils.] de la avena (*Avena sativa* L.) en Michoacán, México. 22: 351-355.
- Maldonado-Torres, R., Álvarez, S.M.E., Almaguer V.G., Barrientos P.A.F. and Garcia, M.R. 2007. Estándares nutrimentales para aguacatero “Hass”. Revista Chapingo Serie Horticultura 13(1): 103-108.
- Martínez P. E., Hío C. J., Osorio A. J., and Torres F. M. 2009. Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. Agronomía Colombiana, Vol. 27, núm. 2.
- McMillan, R.T. 1986. Serious diseases of tropical fruits in Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 99: 224-227.
- Menezes, M. 2002. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do género *Colletotrichum*. Fitopatología Brasileira 27: 523-524,
- Montero, T.V., Morales, G.J.L., González, M.M., Anaya, L.J.L., Corona, T.T. y Gálvez, M.A. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 1: 159-174.
- Naamani, G. 2007. Developments in the Avocado World. California Avocado Society Yearbook 90: 71-96.
- Nitzan, N., Quick, R.A., Hutson, W.D., Bamberg, J. and Brown, Ch. 2010. Partial Resistance to Potato Black Dot, Caused by *Colletotrichum coccodes* in *Solanum tuberosum* Group Andigena.

American Journal of Potato Research 87: 502-508.

- Pereira, L.B., Almeida, M., Alves, G.R.G., Aquino, T.F., Bernardi, W.J. 2010. Caracterização morfo-cultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita. *Ambiência Guarapuava (PR)* 6(3): 451–463
- Peres, N., Kurumae, E., Dias, M. and Souza de, N. 2002. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp., affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology*. 150:128–134.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E. and Hyde, K.D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44: 33-43.
- Prusky, D. McEvoy, J., Leverentz, R., and Conway, W. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology*. 9: 1105-1113.
- Rodríguez-Guerra, R., Acosta-Gallegos, J.A., González-Chavira, M.M. y Simpson, J. 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. *Agricultura Técnica en México*. 32: 101-114.
- SIAP. 2010. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la Producción agrícola por cultivo <http://www.siap.gob.mx>. (Consulta el 19 de Junio del 2010).
- Singh, N. 2008. Sustainable management of red rot disease of sugarcane. *Indian Sugar* 58: 21-30.
- Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E., and Mills, P.R. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 265-281.
- Talhinhas P, Sreenivasaprasad S, Neves-Martins J, Oliveira H. 2005. Molecular and phenotypic

analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2987-2998.

Téliz, O.D. 2000. *El aguacate y su manejo Integrado*. Ed. Mundi Prensa México, S. A. de C. V. 1a Ed. 219 p.

Téliz, O.D. y Mora, A.J.A. 2007. *El aguacate y su manejo Integrado*. Ed. Mundi Prensa México, S. A. de C. V. 2a Ed. 321 p.

Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O. and Taylor, P.W.J. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp) in Thailand. *Plant Pathology* 57: 562-572.

Ureña-Padilla A.R., MacKenzie S.J., Bowen B.W., and Legard D.E. 2002. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. *Phytopathology* 92, 1245-52.

Waller, J.M., Bridge, P. D., Black, B., and Hakiza, G. 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycological Research* 97: 989-994.

Xiao, C.L., MacKenzie, S.J., and Legard D.E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated host. *Phytopathology* 94: 446-453.

Yang Y.L., Liu, Z., Cai, L. and Hyde, K.D. 2012. New species and notes of *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity* 39: 123–46.

## Capítulo IV. Diagnostico molecular de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Leticia Robles-Yerena<sup>1</sup>, Daniel Nieto-Ángel<sup>1</sup>, Daniel Téliz-Ortiz<sup>1</sup>, J. Concepción Rodríguez Maciel<sup>2</sup>, Dr. Mario Orozco Santos<sup>3</sup>, Cristian Nava-Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230. <sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad-Entomología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230 <sup>3</sup>INIFAP – Campo Experimental Tecoman. Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecoman, Colima, México: 28930.  
[lrobles@colpos.mx](mailto:lrobles@colpos.mx)

### Resumen

La antracnosis causada por el género *Colletotrichum* spp. es una de las enfermedades que más limita la venta de la fruta de aguacate. Existen indicios de que son varias las especies involucradas en esta enfermedad en México. El uso de técnicas moleculares ha posibilitado la distinción entre especies del género *Colletotrichum* spp. siendo la herramienta más confiable para construir la clasificación de éste género. En este trabajo se realizó la caracterización molecular de 298 aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de aguacate cultivares Hass y Fuerte de las principales zonas productoras a nivel nacional. El DNA de cada uno de aislados se obtuvo con el protocolo DNeasy® Mini Kit de (QUIAGEN). Los ácidos nucleicos totales fueron extraídos y mediante los iniciadores ITS4 e ITS5 y la reacción en cadena de la polimerasa, la región intergénica fue amplificada, secuenciada y comparada con la base de datos del NCBI mediante la herramienta Blast. Los análisis moleculares mostraron que la región del ITS tiene índices de similaridad con los depósitos KF938897.1, AJ301964.1 y

JX258705.1. En base a las secuencias moleculares se confirmó la presencia de *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), *C. acutatum* (*Glomerella acutata*) y *C. boninense* en frutos de aguacate. Además y por primera vez se presenta evidencia molecular de la presencia de *Colletotrichum simmondsii*, *C. alienum*, *C. kahawae*, *C. aenigma*, *C. jasmini*, *C. fragariae*, *C. higginsianum*, *C. godetiae* y *C. tropicale* en el cultivo de aguacate en México.

**Palabras clave:** *Colletotrichum*, ITS, filogenia, especies

## Chapter IV. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. isolated from avocado fruits in Mexico

### Abstract

Anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. is one of the diseases that most restricts the sales of avocado fruit. There are evidence that several species are involved in this disease in Mexico. The use of molecular techniques enabled identification of species of *Colletotrichum* spp. becoming the most reliable way to classify this genus. In this research, the molecular characterization of 298 isolates of *Colletotrichum* spp isolated from avocado cultivars Hass and Fuerte from the main producing areas nationwide was carried out. DNA from each single-spore culture was extracted using the DNeasy® Mini Kit protocol (QIAGEN). Total nucleic acids were extracted and using the primers ITS4 and ITS5 and Polymerase chain reaction, the intergenic region was amplified, sequenced and compared with the database of the NCBI using the Blast tool. Molecular analyzes showed that the ITS region were similar to KF938897.1, AJ301964.1 and JX258705.1 specimens. Based on this region *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), *C. acutatum* (*Glomerella acutata*) and *C. boninense* were confirmed attacking avocado. Besides and for the first time it is presented molecular evidence of *Colletotrichum simmondsii*, *C. alienum*, *C. kahawae*, *C. aenigma*, *C. jasmini*, *C. fragariae*, *C. higginsianum*, *C. godetiae* and *C. tropicale* on avocado in Mexico.

**Key words:** *Colletotrichum*, ITS, phylogeny, species

## 4.1 Introducción

El género *Colletotrichum* constituye uno de los hongos fitopatógenos más importantes en todo el mundo ya que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en multitud de cultivos. *Colletotrichum* es un patógeno postcosecha que infecta aguacate (*Persea americana* Miller), mango (*Mangifera indica* L.), papaya (*Carica papaya* L.), plátano (*Musa paradisiaca* L.) y otros cultivos (Dickman *et al.* 1994; Ploetz, 1994; Prusky, 1994). En aguacate, tres especies (*C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*) se han reportado induciendo el síntoma de antracnosis, que ocasiona en promedio un 50% de pérdidas (Silva y Ávila, 2011).

La taxonomía del género *Colletotrichum* se basaba en: hospedero, sustrato, tamaño y forma de conidios, forma de apresorios, crecimiento en medio de cultivo, color de colonias, setas, peritecios, etc. (Higgins, 1926; Gorter, 1956; Hindorf, 1973; Johnston y Jones, 1997). Sin embargo, muchas de estas características morfológicas cambian de acuerdo a las condiciones de crecimiento, o después de repetidas siembras *in vitro* (Johnston, 2000). Actualmente se ha observado que la morfología, morfometría y características culturales no puede identificar de forma inequívoca un aislado, por lo que se hace imprescindible el uso de herramientas moleculares que complementen esta identificación. Las regiones del espacio transcrito interno del ADN ribosomal o “Internal Transcribed Spacer” (ITS) ha sido ampliamente usadas para la delimitación de taxas (Dauch *et al.* 2003) y diferenciación entre especies y subespecies de *Colletotrichum* spp. Damm *et al.* (2008) mencionaron que en *Colletotrichum* la región 5.8S, 18S y 28S es conservada y muestra una baja variabilidad, pero los ITS-1 e ITS-2 que se encuentran entre estas regiones de ADN son una zona hipervariable que permite el reconocimiento a nivel interespecífico. Orberá (2004) menciona que estas zonas ofrecen fragmentos de distinto tamaño que permite la diferenciación de especies. Actualmente, se han determinado las secuencias de

nucleótidos de la región ITS de varias especies de *Colletotrichum* spp. que sirven como fuente de comparación en estudios filogenéticos así como el diseño de cebadores específicos que amplifican, por medio de PCR, determinados segmentos de ADN y permiten diferenciar especies del complejo *Colletotrichum* (Adaskaveg y Hartin, 1997; Freeman, *et al.* 1998; Damm *et al.* 2012b). En este sentido, Cannon *et al.* (2012) propone a los ITS como marcador de código de barras de hongos en general, ya que su longitud es mucho mayor que la de cualquier otro gen. Otros genes complementarios para la identificación de *Colletotrichum* son: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), actina (ACT), quitina sintetasa 1 (CHS-1), betatubulina (Tub2), histona 3 (HIS3) y calmodulina (CAL). Los principales oligonucleótidos utilizados para la amplificación de estas regiones son: ITS-1F (Gardes y Bruns, 1993) + ITS-4 (White *et al.* 1990) o V9G (Hoog y Gerrits, 1998) + ITS-4, GDF1 + GDR1 (Guerber *et al.* 2003), ACT-512F + ACT-783R (Carbone y Kohn, 1999), CHS-354R + CHS-79F (Carbone y Kohn 1999), BT2Fd + BT4R (Woudenberg *et al.* 2009) o T1 (O'Donnell y Cigelnik, 1997) + Bt-2b (Glass & Donaldson, 1995), CYLH3F + CYLH3R (Crous *et al.*, 2004b) y CAL 228F + CAL 737R (Carbone y Kohn 1999).

La amplificación de estos genes ha sido útil en el estudio de las “especie complejo”, como lo es el caso de *Colletotrichum gloeosporioides*, que agrupa aislados morfológicamente similares obtenidos de diferentes hospederos. El concepto de “especies complejo” se han puesto a prueba con ayuda de una sencilla prueba de patogenicidad. Por ejemplo, Shear y Wood (1907, 1913) y Pequeño (1926) concluyeron que muchos aislados descritos como diferentes especies en realidad eran la misma especie. Damm *et al.* (2012a) muestran que varias especies consideradas como sinónimos de *C. gloeosporioides* en realidad son miembros del complejo de *C. acutatum* (*C. godetiae*, *Gloeosporium limetticola*, *G. lycopersici* y *G. phormii*), *C. boninense* (*C. dracaenae*) o *C. gloeosporioides* (*C. fragariae*, *C. musae* y *C. kahawae*).



Actualmente se tiene la colección de 300 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* aislado de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis de los principales estados productores de México. La identificación cultural, morfológica y morfométrica basada en 18 variables permitió identificar a *Colletotrichum glosposporioides* y *C. acutatum* como agentes causales de la antracnosis en frutos de aguacate en México. Ambas son consideradas especies complejo y según el análisis multivariado se tiene indicios de al menos cinco grupos están contenidos en estas dos especies. Actualmente se cuenta con las herramientas para poder auxiliar en la identificación previamente realizada, es por ello que se propone la presente investigación que tiene como objetivo el caracterizar molecularmente mediante la amplificación de la región 5.8S, ITS-1, 18S, ITS-2, y 28S de 300 cultivos monospóricos de aguacate.

## **4.2 Materiales y métodos**

### **4.2.1 Extracción de ácidos nucleicos totales**

Trescientos cultivos monospóricos aislados de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis de los estados de la República Mexicana de mayor producción fueron sembrados e incubados durante 10 días a 28°C en medio de cultivo PDA. El micelio obtenido de estos medios de cultivo fue procesado de acuerdo a las recomendaciones del productor del kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, U.S., 2014) para la extracción de ácidos nucleicos totales: De cada cultivo monospórico se tomó una muestra de micelio que fue transferida a un tubo Eppendorf donde se maceró con la punta de una pipeta estéril. Después se le adicionó 400µl de Buffer AP1 y 4µL Rnasa para ser agitado ligeramente e incubado en baño María por 10min a 65°C. Los tubos Eppendorf fueron extraídos y agitados por inversión cada dos minutos. Después de la incubación se adicionaron 130µl del Buffer AP2 y se incubó por 5min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin lila y se

centrifugó por 2min a 14,000 rpm. Se retiró el sobrenadante para colocarlo en un nuevo tubo Eppendorf, al que se le adicionó 675µL del Buffer AP3/E. La mezcla fue colocada en un tubo DNeasy Mini spin, sometiéndolos a centrifugación por 1min a 8,000rpm. La columna fue reemplazada y se agregó 500µl del Buffer AW en la membrana del Mini spin DNeasy para centrifugar por 1min a 8,000rpm. A la membrana se le adicionó 500µl del Buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14,000rpm, con el propósito de lavar al ADN. Finalmente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un tubo eppendorf, adicionandó 100 µl del Buffer AE en la membrana, se incubó por 5min a temperatura ambiente para centrifugar por 1 min a 8,000rpm (QIAGEN, 2013). Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su uso.

#### 4.2.2 Amplificación vía PCR

Para amplificar parcialmente al gen 18S, completamente al ITS-1, completamente al gen 5.8S, completamente al ITS-2, y parcialmente al gen 28S de 300 cultivos monospóricos aislados de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis de los principales estados productores de México se utilizaron los iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) y el siguiente programa de termociclado (White *et al.* 1990):

Numero de ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95°C	2 minutos
30 ciclos	95°C	1 minuto
	55°C	0.5 minuto
	74°C	2 minutos
1 ciclo	74°C	10 minutos

La secuenciación de los productos amplificados se llevó a cabo con el método de Sanger en la empresa Macrogen (Korea).

#### **4.2.3 Análisis de las secuencias**

Las secuencias del gen 18S (parcial), ITS-1 (completa), gen 5.8S (completa), ITS-2 (completa) y gen 28S (parcial) de 300 cultivos monospóricos fueron comparadas con las depositadas en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information con ayuda de la herramienta Blast. Las secuencias con mayor similitud fueron extraídas del banco de datos para los análisis filogenéticos. Para ello, tanto las secuencias obtenidas de frutos de aguacate como las extraídas del banco de datos fueron alineadas (Cluster W) y después procesadas mediante el procedimiento UPGMA en el programa Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

#### **4.3 Resultados y Discusión**

Se logró amplificar parcialmente al gen 18S, completamente al ITS-1, completamente al gen 5.8S, completamente al ITS-2, y parcialmente al gen 28S de 298 cultivos monospóricos aislados de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis de los principales estados productores de México. Existieron dos cultivos monospóricos en los cuales no fue posible llevar a cabo la amplificación de dicho fragmento de ácidos nucleicos posiblemente debido a la presencia de fenoles, azúcares o lípidos presentes en el micelio. El fragmento amplificado en los restantes 298 aislados tenía un peso que oscilaba de 554 a 665 pares de bases (pb).

Según el análisis derivado de la herramienta Blast del NCBI y tomando en cuenta el máximo índice de similitud, mayor cobertura y menor valor de E se encontró lo siguiente: 82 cultivos monospóricos son *Colletotrichum gloeosporioides*, 61 *Glomerella cingulata*, 37 *C. boninense*, 30 *C. simmondsii*, 26 *C. alienum*, 15 *Glomerella acutata*, 15 *C. kahawae*, 15 *C. aenigma*, 6 *C. jasmini*, 4 *C. fragariae*, 3 *C. acutatum*, 2 *C. higginsianum*, 1 *C. godetiae* y 1 *C. tropicale*.

*Colletotrichum gloeosporioides* (fase sexual *Glomerella cingulata*) fue la especie con mayor presencia (47.98%) en síntomas de antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México. Del estado de Michoacán se obtuvieron 19 aislados, de Morelos 24, de Nayarit 23, de México 12, de Puebla 29 y de Jalisco 36. En Michoacán y México, estudios basados en la amplificación de la región ITS que fueron llevados a cabo por Silva-Rojas y Ávila-Quezada (2011), coinciden con lo reportado en esta investigación pues ellos aseguran que *C. gloeosporioides* es especie en mayor presencia (71%) causando antracnosis en frutos maduros e inmaduros de aguacate. Guillén-Andrade *et al.* (2010) reportan que en municipios de la franja aguacatera de Michoacán esta presente *C. gloeosporioides* al amplificar su genoma con el iniciador CgInt/ITS4. En otras parte del mundo, Giblin *et al.* (2010) y Giblin y Coates (2007) mencionan haber aislado únicamente a *C. gloeosporioides* de aguacate en Nueva Gales del Sur y el sureste de Queensland (Australia). Willingham *et al.* (2000) señalaron que en Australia, la antracnosis en el cultivar "Hass" es causada principalmente por *C. gloeosporioides*. Nelson (2008) también coincide en reportar a *C. gloeosporioides* en Hawaii y Sanders and Korsten (2003) reportaron a *C. gloeosporioides* aislados de aguacates en el Sudáfrica. *Glomerella cingulata* (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides*) ha sido también reportado como un agente causal de la antracnosis en frutos de aguacate en todo el mundo (Prusky, 1996). En un estudio realizado en México por Ávila-Quezada *et al.* (2007) indicaron que el 86% de los aislados utilizados en su estudio fueron *G. cingulata* con números de acceso de EF221828, EF221829 y EF221830 en el GenBank.

*Colletotrichum boninense* fue la segunda especie de mayor presencia (12.41%) en síntomas de antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México. Se obtuvieron 7 aislados de Michoacán, 10 de Morelos, 3 de Nayarit, 5 de México, 9 de Puebla y 3 de Jalisco. Silva-Rojas y Ávila-Quezada (2011) encontraron en Michoacán a *C. boninense* y la reportan como una nueva especie que ataca frutos de aguacate con una frecuencia de aislamiento del 13%.

*Colletotrichum simmondsii* fue la tercera especie de mayor presencia (10.06%) en síntomas de antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México. En Michoacán se obtuvieron 4 aislados, 8 de Morelos, 11 de México y 7 de Puebla. De Nayarit y Jalisco no fue posible aislar esta especie. Recientemente se ha encontrado que *C. simmondsii* afectan raíces, hojas y frutos de aguacate (Hyde *et al.* 2009; Damm *et al.* 2012a; Dórea 2013; Weir *et al.* 2012). Weir *et al.* (2012) y Álvarez *et al.* (2014) reportaron que *C. simmondsii* en Australia de donde fue aislado de frutos de *Carica papaya*, *Fragaria ananassa*, *Mangifera indica* y *Protea cynaroides*.

*Colletotrichum alienum* fue la cuarta especie en orden de importancia y se presentó en un 8.72% del total de los aislados, observándose 7 aislados en Michoacán, 1 de Morelos, 8 de Nayarit, 4 de Puebla y 6 de Jalisco. En el estado de México no fue detectada esta especie. *C. alienum* ha sido aislado de *Persea americana* en Australia y Nueva Zelanda y su identificación fue realizada mediante ITS (JX010217, JX010246) (Weir y Johnston, 2009, Weir *et al.* 2012 y Álvarez *et al.* 2014).

Para *Colletotrichum acutatum* (fase sexual *Glomerella acutata*) se obtuvo una frecuencia de 6.04%. En el estado de Michoacán se encontraron 3 aislados, en Morelos 1, en Nayarit 1, en México 4, en Puebla 7. En Jalisco esta especie no fue detectada. Silva-Rojas y Ávila-Quezada (2011) reportaron que en el estado de Michoacán, se presentó *C. acutatum* como la especie de segunda importancia (16%). Guillén-Andrade *et al.* (2010), afirmaron de la presencia de *C. acutatum* al amplificar su genoma con el iniciador Calnt-2/ITS4, en municipios de la franja aguacatera de Michoacán. También Willingham *et al.* (2000) afirmaron de la presencia de *C. acutatum* en aguacate Hass, siendo esta de menor importancia en Australia. Por otro lado, Avila-Quezada *et al.* (2007) reportaron a *C. acutatum* causando antracnosis en frutos de aguacate en Michoacán estado de México y Nelson (2008) menciona que en Nueva Zelanda, *Colletotrichum acutatum* causa la antracnosis del aguacate. El teleomorfo, *G. acutata*, ha sido identificado como la causa de la antracnosis en aguacate en Mexico. Avila-Quezada *et al.* (2007) reporta que en Michoacán, el 14% de sus aislados eran de *G. acutata* (EF175780, EF221831 y EF221832). En Nueva Zelanda (Hartill, 1991; Nelson 2008) y Australia (Simmonds, 1965) también se ha encontrado a *Glomerella acutata* ocasionado la antracnosis del aguacate.

*Colletotrichum kahawae* se presentó en el 5.03% de los aislados, siendo el estado de Michoacán donde tuvo más frecuencia (11 aislados), Morelos (1 aislamiento), México (2 aislados) y Puebla (1 aislamiento). En Nayarit y Jalisco no fue posible encontrarlo. Weir *et al.* (2012) mencionan que en la localidad de Te Puke, Nueva Zelanda aislaron a *C. kahawae* de *Persea americana* en frutos con pudrición. *C. kahawae* subsp *ciggaro* es reportado en Australia, Alemania, Nueva Zelanda y Sudáfrica en el cultivo de *Persea americana* (Weir y Johnston, 2009) y ha sido también aislada de *Coffea arabica* en Angola (Weir *et al.* 2012). Silva *et al.* (2012), en pruebas de patogenicidad han demostrado que sólo algunas cepas de *C. kahawae* son capaces de causar la enfermedad en frutos de

café y que estas cepas pueden distinguirse utilizando GS. Álvarez *et al.* (2014) reportan la presencia de *C. kahawae* subsp. *cigaro* aislada de *Olea europea* en Australia y aislamiento de *C. kahawae* subsp. *kahawae* de *Coffea arabica* en Kenya con amplificaciones con ITS de (JX010230) y (JX010231).

*Colletotrichum aenigma* se presentó en un 5.03% de los aislados de los estados de Morelos (5 aislados), Nayarit con (2 aislados), México (1 aislamiento) y Puebla (7 aislados). En Michoacán y Jalisco no encontró a esta especie. Weir y Johnston (2009) reportaron a *C. aenigma* aislada de *Persea americana* en Israel. Esta especie fue identificada utilizando los ITS (JX010244) (Weir *et al.* 2012). Álvarez *et al.* (2014) también reporta a *C. aenigma* en frutos de *Persea americana* en Israel y de *Pyrus pyrifolia* en Japón, utilizando a los ITS para su identificación (JX010244) y (JX010243).

*Colletotrichum jasmini* fue encontrado en el 2.01% de los aislados provenientes de Morelos (2 aislados), Nayarit (1 aislamiento), Puebla (2 aislados) y Jalisco (1 aislamiento). En Michoacán y México no se detectó esta especie. No hay reportes previos de esta especie en aguacate, por lo que es recomendable conciliar las características culturales, morfológicas y morfométricas para los aislados. *C. jasmini* se ha encontrado en hojas de *Sambac Jasminum* en Vietnam (Weir *et al.*, 2012). Wikee *et al.* (2011) han encontrado muchas similitudes entre *C. jasmini* y *C. siamense*.

*Colletotrichum fragariae* fue encontrada en el 1.34% de total de los aislados. Los cultivos provenían del estado de Michoacán (1 aislamiento) y Puebla (3 aislados). No hay reportes previos de esta especie en aguacate, por lo que es recomendable conciliar las características culturales, morfológicas y morfométricas para los aislados. Weir *et al.* (2012) menciona que *C. fragariae* es similar a *Colletotrichum theobromicola* y ha sido aislada de *Fragaria ananasa* en USA que fue identificada mediante ITS (JX010286).

*Colletotrichum higginsianum* se encontró en el 0.33% de los aislados. El único aislamiento obtenido proviene del estado de Michoacán. No hay reportes previos de esta especie en aguacate, por lo que es recomendable conciliar las características culturales, morfológicas y morfométricas para los aislados. Perfect *et al.* (1999) y O'Connell *et al.* (2004) reportan que *C. higginsianum* parasita al género *Brassica*, donde ocasiona pérdidas en la cosecha sobre todo en climas templados (Huser *et al.* 2009).

*Colletotrichum godetiae* fue aislado con una frecuencia del 0.66%. Los dos aislados encontrados provienen del estado de Michoacan y Morelos. No hay reportes previos de esta especie en aguacate, por lo que es recomendable conciliar las características culturales, morfológicas y morfométricas para los aislados. *Colletotrichum godetiae* fue descrita a partir de semillas de *Godetia* (Neergard, 1943; Neergard 1950). Damm *et al.* (2012a) reporta haber obtenido a *C. godetiae* de *Solanum betaceum* en frutos con síntomas de antracnosis en Colombia, la cual fue identificada utilizando ITS (JQ948440) y de ramas con síntoma de necrosis de *Ugni molinae* en Chile, identificada también con ITS (JQ948442). Vinnere *et al.* (2002) la aisló de frutas, hojas o tallos de *Fragaria*, *Malus* y *Prunus* en Europa y el Cercano Oriente. Alvarez *et al.* (2014) mencionan el aislamiento de *C. godetidae* de *Clarkia hybrida* en Dinamarca (identificada mediante ITS: JQ948402).

*Colletotrichum tropicale* fue aislado con una frecuencia del 0.33% solamente del estado de Nayarit. No hay reportes previos de esta especie en aguacate, por lo que es recomendable conciliar las características culturales, morfológicas y morfométricas para los aislados. Rojas *et al.* (2010) señaló que *C. tropicale* se encuentra en los bosques tropicales de América, en frutas en descomposición y plantas.



Rojas *et al.* (2010) señala que *C. tropicale* es genéticamente muy cercano a *C. siamense*. Ambas especies comparten una serie de características morfológicas. En Panamá *C. tropicale* ha sido encontrado sobre hojas de *Theobroma cacao*, en Colombia en flores y frutos de *Annona muricata*, en Japón, en hojas de *Litchi chinensis*. La identificación de esta especie se ha realizado utilizando la region del ITS (JX010264), (KC512125), (KC512128) y (JX010275) (Rojas *et al.*, 2010 y Weir *et al.*, 2012 y Alvarez *et al.* 2014).

Filogenéticamente el género *Colletotrichum* comprende nueve grupos (Cannon *et al.* 2012). De estos grupos sobresalen el grupo *C. gloeosporioides* incluye 22 especies que muestran pocas diferencias en los loci, pero es muy diverso en términos de morfología e incluye un significativo número de patógenos en plantas como *C. alienum*, *C. aenigma*, *C. tropicale*, *C. gloeosporioides* y *C. kahawae*. El grupo *C. boninense* es un taxón hermano del clado *gloeosporioides*, donde se identifican tres subgrupos con 14 especies (Damm *et al.* 2012b). En el grupo *C. acutatum* se encuentran 29 especies (Damm *et al.* 2012a) entre las que se cuentan a *C. acutatum*, *C. simmondsii* y *C. godetidae* (Sreenivasaprasad y Talhinhos, 2005). El grupo *C. destructivum* contiene a *Colletotrichum destructivum*, *C. fuscum*, *C. higginsianum* y *C. linicola*. *C. higginsianum* se ha considerado como sinónimo de *C. destructivum* (Sun y Zhang, 2009) debido a la similitud de secuencias ITS.

La figura 1 muestra el análisis filogenético de 298 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* aislados de aguacate con síntomas de antracnosis de los principales estados productores de México. En el árbol filogenético se observa dos grandes grupos. **En el grupo más grande**, que se ubica en la parte superior del dendograma, se pueden encontrar todos los aislados que corresponden al grupo *C. gloeosporioides* (desde JalEscati301 a MichTacam32) y donde estan ubicadas las especies tipo, *C. alienum*, *Glomerella cingulata*, *C. gloeosporioides* y *C. tropicale*. En concordancia con la literatura

(Damm *et al.* 2012b) se detectó un grupo hermano donde se encuentra los aislados del grupo *C. boninense*. En este mismo grupo se encontró a *C. kahawae* que actualmente se ubica en el grupo de *C. gloeosporioides*. La gran heterogeneidad genética detectada en este estudio complementa la información obtenida en los dos capítulos anteriores, donde se había observado una gran variabilidad en aspectos culturales, morfológicos, de patogenicidad y virulencia cruzada. Este mismo fenómeno también es apreciable en los aislados del grupo acutatum que se describe a continuación.

**En el segundo gran grupo** se encuentran los aislados (de PueToch252 a MichZita51) del grupo *C. destructivum* (*C. higginsianum*) y los aislados (de MorYecapix88 a PueTochimil256) del grupo *C. acutatum* (*C. acutatum*, *C. simmondsii* y *G. acutada*).

Trece aislados (De MichPer23 a JalSayula287) presentaron diferencias considerables que permitieron agruparlos en ramas separadas y posiblemente correspondan a otras especies aún no identificadas en el cultivo. Finalmente el aislamiento MichPer18 resultó estar emparentado con *C. fragariae*.



**Figura 1.** Análisis filogenético de 298 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* aislados de aguacate con síntomas de antracnosis de los principales estados productores de México. Las secuencias fueron alineadas (Cluster W) y después procesadas mediante el procedimiento UPGMA en el programa Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

#### 4.4 Conclusiones

1. Dos cientos noventa y ochos cultivos monospóricos obtenidos de aguacate con síntomas de antracnosis de los principales estados productores de México fueron caracterizados molecularmente mediante la aplicación de la región 5.8S, ITS-1, 18S, ITS-2, y 28S con los primers ITS5 e ITS4.
2. Basado en el análisis de las secuencias obtendias se confirmó la presencia de dos especies complejo (*Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum*).
3. Se confirmó la presencia de *C. boninense* agente causal de la antracnosis en aguacate en México.
4. Por primera vez se presenta evidencia molecular de la presencia de *Colletotrichum simmondsii*, *C. alienum*, *C. kahawae*, *C. aenigma*, *C. jasmini*, *C. fragariae*, *C. higginsianum*, *C. godetiae* y *C. tropicale* ocasionando la antracnosis en el cultivo de aguacate en México.

**Anexo C.** Caracterización en Molecular de 300 aislados monospóricos de *Colletotrichum* obtenidos de frutos con antracnosis en aguacate de los principales estados productores de México.

Table with 300 rows of molecular characterization data for *Colletotrichum* isolates. The table contains columns for isolate ID, accession number, and other molecular markers, but the text is too small to read.

## 4.5 Literatura citada

- Adaskaveg, J. and Hartin, R. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*. 87: 979-987.
- Alvarez, E. 2014. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *European Journal of Plant Pathology* 139: 325-338.
- Avila-Quezada, G., Silva-Rojas, H.V. and Téliz-Ortiz, D. 2007. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* Causing Anthracnose on avocado fruits in Mexico. *Plant disease* 91(9): 1200.
- Álvarez, E., Gañán, L., Rojas-Triviño, A., Mejía, J.F., Llano, G.A. and González, A. 2014. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *Eur J Plant Pathol* (2014) 139:319–332.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., and Weir, B.S. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181–213.
- Carbone, I., and Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Risede, J.M., and Hywel-Jones, N.L. 2004b. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. *Studies in Mycology* 50: 415–430.
- Damm, U., Mostert, L., Crous, P.W., and Fourie, P.H. 2008. Novel *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of *Prunus* trees. *Persoonia* 20: 87–102.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., and Crous, P.W. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37–113.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., and Weir, B.S. 2012b. The

*Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1–36.

Dauch, A., Watson, A., and Jabaji-Hare, S. 2003. Detection of the biocontrol agent *Colletotrichum coccodes* (183088) from the target weed velvetleaf and from soil by strain-specific PCR markers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 51-64.

Dickman *et al.* 1994;

Dórea, B.C.A. 2013. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. Associated with fruits in Brazil. Thesis of Doctor of Science in Plant Pathology. University of Sao Paulo “Luiz de Queiroz” College of Agriculture. Avenida Padua Dias 11, Piracicaba, Sao Paulo, Brasil. 70 p.

Freeman, S., Katan T, and Shabi E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates from Avocado and Almond Fruits with Molecular and Pathogenicity Tests. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3):1014–1020.

Gardes, M., and Bruns, T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.

Giblin F. and Coates L. 2007. Avocado fruit responses to *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) 2007. Viña Del Mar, Chile. 12 – 16 Nov. ISBN No 978-956-17-0413-8.

Giblin, F.R., Coates, L.M. y Irwin, A.G. 2010. Pathogenic diversity of avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose and pepper spot in Australia. *Australian Plant Pathology* 39: 50-62.

Glass, N.L., and Donaldson, G. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.

Gorter, G.J.M.A. 1956. Anthracnose fungi of olives. *Nature* 178: 1129–1130.

- Guillén-Andrade, H., Gutiérrez, M. Lara-Chávez, M.B.N. Chávez T., Vidales-Fernández, A., Ochoa, S. y López-Medina. J. 2010. Antracnosis: una investigación sobre su agente causal en la franja aguacatera de Michoacán, México. Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate) Viña Del Mar, Chile. 12 – 16 Nov. 2007. ISBN No 978-956-17-0413-8.
- Guerber, J.C., Liu, B., Correll, J.C., Johnston, P.R. 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.
- Hartill, W.F.T. 1991. Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 19: 297-304.
- Higgins, B.B. 1926. Anthracnose of pepper (*Capsicum annum* L.). *Phytopathology* 16: 333–345.
- Hindorf, H. 1973). *Colletotrichum*-Population auf *Coffea arabica* L. in Kenia II. Qualitative und quantitative Unterschiede in der *Colletotrichum*-Population. *Phytopathologische Zeitschrift* 77: 216–234
- Hoog, G.S. de, and Gerrits, van den E.A.H.G. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycoses* 41: 183–189.
- Huser, A., Takahara, H., Schmalenbach, W., and O’Connell, R. 2009. Discovery of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose fungus, *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 143–156.
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, 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: 147-183.



- Johnston, P.R. 2000. The importance of phylogeny in understanding host relationships within *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: host specificity, pathogenicity, and host-pathogen interactions* (Prusky, D., Dickman, M.B., Freeman, S. eds). APS Press, St Paul, Minnesota: 21–28.
- Johnston, P.R. and Jones, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89: 420–430.
- Neergaard, P. 1943. Aarsberetning fra J. E. Ohlens Enkes Plantepatologiske Laboratorium 1. April 1942–31. Marts 1943. J. D. Qvist & Komp. Bogtrykkeri Akts., København, Danmark.
- Neergaard, P. 1950. Mycological Notes III. 7. *Colletotrichum godetiae* Neerg. 8. *Phoma bellidis* Neerg. 9. *Zygosporium parasiticum* (Grove) Bunting & Mason. 10. *Peronospora dianthicola* Barthelet. *Friesia* 4: 72–80.
- Nelson, S. 2008. Anthracnose of Avocado. *Plant Disease* PD-58: 1-6
- O’Connell, R, Herbert, C., Sreenivasaprasad, S., Khatib, M., and Esquerré-Dugayé, M.T. 2004. A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:272–282.
- O’Donnell, K., and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:103–116.
- Orberá, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21:15-19. On line. <<http://www.reviberoammicol.com/2004-21/015019.pdf>>.
- Pequeno, 1926
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O’Connell, R.J., and Green, J.R. 1999. *Colletotrichum: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions*. *Fungal Genetics and Biology* 27:186–198.

- Ploetz, R.C. 1994. Panamá disease: return of the first banana menace. *Intern. J. Pest Manag.* 40: 326-336.
- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* 34: 413-434.
- Rojas, E.I., Rehner, S.A., Samuels, G.J., Van Bael, S.A., and Herre, E.A. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102: 1318–1338.
- Sanders, G.M. and Korsten, L. 2003. A comparative morphological study of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Can. J. Bot.* 81 (8):877-885.
- Shear, C.L., and Wood, A.K. 1907. Ascogenous forms of *Gloeosporium* and *Colletotrichum*. *Botanical Gazette* 43: 259–266.
- Shear, C.L., and Wood, A.K. 1913. Studies of fungus parasites belonging to the genus *Glomerella*. *USDA Bureau of Plant Industry Bulletin* 252: 1–110.
- Silva, D.N., Talhinas, P., Várzea, V., Cai, L., Paulo, O.S., and Batista, D. 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.
- Silva-Rojas, H.V. and Avila-Quezada, G.D.A. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology* 60: 899–908.
- Simmonds, J.H. 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science* 22: 437-459.
- Sreenivasaprasad, S. and Talhinas, P. 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Molecular*

Plant Pathology 6: 361–378.

- Sun, H., Zhang, J.Z. 2009. *Colletotrichum destructivum* from cowpea infecting *Arabidopsis thaliana* and its identity to *C. higginsianum*. European Journal of Plant Pathology 125: 459–469.
- Vinnere, O., Fatehi, J., Wright, S.A.I. and Gerhardson B (2002). The causal agent of anthracnose of Rhododendron in Sweden and Latvia. Mycological Research 106: 60–69.
- Weir, B.S., Johnston P.R. and Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73: 115–180.
- Weir, B.S., and Johnston, P.R. 2009. Defining and delimiting genetic species in *Colletotrichum*. Asian Mycological Congress 2009. Taichung Taiwan November 15–19. pg 0-128.
- Wikee, S., Cai, L., Pairin, N., McKenzie, E.H.C., and Su, Y.Y. 2011. *Colletotrichum* species from Jasmine (*Jasminum sambac*). Fungal Diversity 46: 171–182.
- Willingham, S.L., Cooke, A.W., Coates, L.M. and Pegg, K.G. 2000. Pepper spot: a new preharvest *Colletotrichum* disease of avocado cv. Hass. Australasian Plant Pathology 29: 151.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds), Academic Press, San Diego: 315–322.
- Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., Gruyter, J. de, Spiers, A.G., and Crous, P.W. 2009. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. Persoonia 22: 56–62.

## Capítulo V. Resistencia a fungicidas de aislados de *Colletotrichum* spp. aislado de frutos de aguacate en México

Leticia Robles-Yerena<sup>1</sup>, Daniel Nieto-Ángel<sup>1</sup>, Daniel Téliz-Ortiz<sup>1</sup>, J. Concepción Rodríguez Maciel<sup>2</sup>, Dr. Mario Orozco Santos<sup>3</sup>, Cristian Nava-Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230. <sup>2</sup>Instituto de Fitosanidad-Entomología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, México: 56230 <sup>3</sup>INIFAP – Campo Experimental Tecoman. KM. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Col. Predio La Escondida Tecoman, Colima, México: 28930. [lrobles@colpos.mx](mailto:lrobles@colpos.mx)

### Resumen

La demanda del aguacate se ha incrementado debido a que el fruto se ha incorporado en la dieta alimenticia de muchos países. Michoacán se ha mantenido como el principal productor y exportador del aguacate en el mundo, pero el rendimiento potencial de este cultivo aún no ha sido explotado al máximo debido a diferentes problemas que limitan su producción, donde destacan las enfermedades que afectan al fruto. La antracnosis del aguacate, causada por *Colletotrichum* spp. se presenta en todas etapas fenológicas del fruto, causando mayor problema durante pre y postcosecha. Numerosas investigaciones se han realizado con el fin de controlar la antracnosis, pero aún no se ha encontrado un fungicida que ofrezca un buen control, por lo cual en el presente trabajo se planteó como objetivo determinar el nivel de resistencia del patógeno *Colletotrichum* spp. Aislados de plantaciones de aguacate de Michoacán, Morelos, edo. de México, Puebla, Nayarit y Jalisco al Thiabendazol, Propiconazol y Tebuconazol. Los bioensayos se realizaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar

(PDA®) adicionados con diferentes concentraciones de los fungicidas. Los medios inoculados con un bocado micelial del hongo se incubaron en oscuridad a 28 °C por 10 días. La concentración efectiva 50 % (CE<sub>50</sub>) y 95 % (CE<sub>95</sub>) para cada aislado se estimó mediante análisis Probit del porcentaje de inhibición del crecimiento relativo del patógeno. Los valores CE<sub>50</sub> en Thiabendazol variaron de 0.0713 a 1063 mg L<sup>-1</sup>; y los de CE<sub>95</sub> de 0.4583 a 7512 mg L<sup>-1</sup>. La mayor proporción de resistencia (PR) a nivel de CE<sub>95</sub> se observó en dos aislados del estado de Jalisco (JalTux276 y JalZapotil279) (>500 x) correspondientes al estado telemorfo *Glomerella cingulata* de *Coletotrichum*. Los valores CE<sub>50</sub> en Propiconazol variaron de 0.0173 a 1.4248 mg L<sup>-1</sup>; y los de CE<sub>95</sub> de 0.1350 a 91.085 mg L<sup>-1</sup>. Los valores más altos de PR a nivel de CE<sub>95</sub> se observó en los aislados MichArio11, AlmolA156, MorOcui57, MorYecapix81 y NayTepic125 (> 20x). Los valores para CE<sub>50</sub> en Tebuconazol variaron de 0.0522 a 8.0719 mg L<sup>-1</sup> y los de CE<sub>95</sub> de 4.4531 a 1034 mg L<sup>-1</sup>. La PR a nivel CE<sub>95</sub> entre el aislamiento sensible y los más tolerantes fue de 34.419 a 43.796x, correspondiente a los aislados PueZacapal209 y MichUru5.

**Palabras clave:** Fungicidas, control, antracnosis

## Chapter V. Fungicide resistance of isolates of *Colletotrichum* spp. from avocado fruits in Mexico

### Abstract

Avocado demand has increased because the fruit has been incorporated into the diet of several countries. Michoacán has remained as the main producer and exporter of avocado in the world, but the potential yield of this crop has not yet been fully exploited due to different problems that limit their production, which include diseases affecting the fruit. Avocado anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. affects during in all phenological stages of the fruit, causing more problems during pre and post harvest. Numerous investigations have been performed in order to control anthracnose, but still has not found a fungicide that provides good control, so in this research our goal was to determine the level of resistance of the pathogen *Colletotrichum* spp. isolated avocado orchards in Michoacan, Morelos, Mexico, Puebla, Nayarit and Jalisco states to thiabendazole, propiconazole and tebuconazole. Bioassays were performed in Potato Dextrose Agar (PDA®) medium amended with different concentrations of the fungicide. Media inoculated with the fungus were incubated in dark at 28 ° C for 10 days. The 50% effective concentration (EC50) and 95% (EC95) was estimated for each isolated by Probit analysis of the percentage inhibition relative growth of the pathogen. Thiabendazole EC50 values ranged from 0.0713 to 1063 mg L<sup>-1</sup>; and those of CE95 of 0.4583 to 7512 mg L<sup>-1</sup>. The largest proportion of resistance (PR) CE95 level was observed in two isolates of Jalisco (JalTux276 and JalZapotil279) (> 500 x) that correspond to the telemorfic state *Glomerella cingulata*. The EC50 values ranged from 0.0173 to propiconazol 1.4248 mg L<sup>-1</sup>; and those of CE95 of 0.1350 to 91,085 mg L<sup>-1</sup>. Higher values of PR EC95 level was observed in MichArio11, Almola156, MorOcui57, and NayTepic125 MorYecapix81 (> 20x) isolates. EC50 values for tebuconazole ranged from 0.0522 to 8.0719 mg L<sup>-1</sup> of CE95 and 4.4531 to 1034 mg L<sup>-1</sup>. CE95 the PR level insulation between sensing and 34,419 was more tolerant to 43.796 x, and corresponding to MichUru5 PueZacapal209 isolates.

**Key words:** Fungicides, control, anthracnose

## 5.1 Introducción

El aguacate es originario de México y Centroamérica, existiendo evidencia de su selección y consumo en México desde hace 10000 años (Smith, 1966; Sánchez et al., 2001). Este frutal es considerado como una de las mayores contribuciones nutricionales de América al mundo (Zentmyer, 1998), cultivándose actualmente en 60 países, entre los que México sobresale como primer productor con 102.467ha; sin embargo, la producción en México por unidad de superficie es menor ( $10,2t \cdot ha^{-1}$ ) que otros países como Brasil ( $14,4t \cdot ha^{-1}$ ), República Dominicana ( $12,7t \cdot ha^{-1}$ ), Israel ( $11,2t \cdot ha^{-1}$ ) y Colombia ( $10,5t \cdot ha^{-1}$ ; FAOSTAT, 2005).

Michoacán ocupa el primer lugar entre los 28 estados que producen aguacate, con 85 por ciento de la producción. El año pasado produjo un millón 193 mil 570 toneladas, de las cuales destinó 600 mil al mercado de exportación. En todo el mundo la producción está sujeta a grandes pérdidas debido a factores bióticos y abióticos que prevalecen en las zonas de cultivo (Gutiérrez, 2008). En cuanto a las enfermedades de origen biótico, las que afectan directamente al fruto se han convertido en la mayor amenaza del comercio internacional, debido a que la fruta para exportación debe ser de la más alta calidad (Pegg *et al.* 2007).

Dentro de las enfermedades que limitan la producción del aguacate, la antracnosis, ocasionada por el hongo *Colletotrichum* spp. continua siendo de los principales problemas de pre y postcosecha (Pegg *et al.* 2007). La antracnosis es muy difícil de combatir ya que la infección ocurre en el huerto en frutos inmaduros, pero el hongo permanece quiescente en la cutícula de la cáscara hasta que los niveles de dieno (compuesto anti fúngico presente en la epidermis del fruto) disminuyen, lo cual ocurre con la maduración del fruto, manifestándose la enfermedad en una forma acelerada (Chakravarty, 1957; Muirhead y Deverall, 1981).

Las estrategias para el control de esta enfermedad deben realizarse durante la fase productiva y durante la postcosecha (Pegg *et al.* 2007). En Michoacán se han tenido daños en precosecha por esta enfermedad de hasta un 74% (Téliz, 2000) e incluso pérdidas totales en postcosecha (Fitzell, 1979; Pegg *et al.* 2007). Los fungicidas son el factor más importante para el manejo de la enfermedad pues si son aplicados a tiempo pueden prevenir la infección (Brent y Hollomon, 1988). Los fungicidas son importantes para el manejo de enfermedades en cultivos agrícolas; para que sean efectivos deben aplicarse antes de que se haya establecido una infección exitosa y en cantidad suficiente para lograr una cobertura adecuada de la planta u órgano afectado; sin embargo, la protección que ofrecen es temporal debido a que están sujetos a efectos del medio ambiente (Brent y Hollomon, 1998). El escaso control que en ocasiones ofrecen los fungicidas se puede deber a baja efectividad del producto, método de aplicación y tiempo inadecuado, condiciones ambientales y resistencia del patógeno al fungicida. Entender qué es la resistencia, cómo se desarrolla y cómo puede manejarse son aspectos cruciales para un manejo de la enfermedad seguro y sustentable (Damicone, 2000).

*Colletotrichum* sp. causa una infección que permanece quiescente durante el desarrollo del fruto (Jeffries *et al.* 1990; Gutierrez-Alonso *et al.* 2002) cuando se lleva a cabo la aplicación intensiva de fungicidas para proteger los frutos. En este sentido, el hongo está expuesto durante un prolongado tiempo a los fungicidas. Este hongo posee una gran capacidad de adaptación y variabilidad (Alahakoon *et al.*, 1992), lo que incrementa la posibilidad de seleccionar cepas resistentes (Dekker, 1977; Delp, 1980). En México, el control de la antracnosis en mango se ha basado en el uso de fungicidas benzimidazoles (Vega, 1994; Becerra-Leor, 1995), lo cual provoca una increíble presión de selección sobre el hongo, contribuyendo a la aparición de cepas resistentes (Dekker, 1977; Delp, 1980).

Los fungicidas más utilizados pertenecen al grupo de los Benzimidazoles (Benomilo, Thibendazol y Carbendazim). Desafortunadamente, debido al empleo indiscriminado de estos



productos se ha reportado resistencia de *Colletotrichum* a los Benzimidazoles (FRAC, 2014, Gutiérrez y Gutiérrez, 2003). Otros grupos alternativos para el control de antracnosis son los Triazoles (Hexaconazol, Propiconazol, Triadimefon), Imidazoles (Prochloraz e Imizalil), Estrobilurinas (Azoxistrobin, Trifloxystrobin) y Protectantes (Clorotalonil, Mancozeb y Oxicloruro de cobre) que permiten utilizar rotación de productos para minimizar el riesgo de generar resistencia (Nieto *et al.* 2003). Las estrobilurinas, debido a su origen natural y amplio espectro de acción, se están posicionando como fungicidas sistémicos líder. La azoxistrobina (Metil E) -2- {2- [6- (2cyanophenoxy) pirimidin-4-ilo] fenil} -3-metoxiacrilato de metilo) ha mostrado un excelente control del moho gris (*Botrytis cinerea*), la mancha foliar (*Cercospora beticola*), la cenicilla (*Erysiphe betae*), el punto negro (*Guignardia citricarpa*) y la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Slawewski *et al.* 2002; Anesiadis *et al.* 2003; Miles *et al.* 2004). La resistencia a fungicidas puede detectarse y medirse de varias formas, dependiendo de la combinación fungicidapatógeno; no obstante, el reconocimiento de una cepa como resistente debe realizarse a través de la comparación con cepas sensitivas al fungicida en cuestión (Georgopoulos, 1982). Desafortunadamente se desconoce el nivel de resistencia de *Colletotrichum* aislado de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis de toda la República Mexicana. El conocer el nivel de resistencia de *Colletotrichum* sp. a los principales fungicidas aplicados para su control en México ofrece ventajas importantes para su mejor manejo (Danicone, 2000). Es por ello que se plantea la presente investigación que tiene como principal objetivo el determinar el nivel de resistencia de *Colletotrichum* aislado de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis de toda la República Mexicana.

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Aislados utilizados

Se emplearon cinco aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de aguacate de huertos comerciales de Michoacán y Jalisco. Dos aislados fueron seleccionados al azar de los obtenidos de parcelas sin historial de aplicación de fungicidas (JalSayula286 y JalSayula287) y dos aislados fueron seleccionados aleatoriamente de los colectados de parcelas con un historial de aplicación de fungicidas (MichUru5, MichUru6 y JalTux275) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Aislados considerados para la obtención de la ventaba biológica de los fungicidas

Aislado	Localidad	Especie
MichUru5	Michoacán, Uruapan	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MichUru6	Michoacán, Uruapan	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
JalTux275	Jalisco, Tuxpan	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
JalSayula286	Jalisco, Sayula	<i>Colletotrichum alienum</i>
JalSayula287	Jalisco, Sayula	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

### 5.2.2 Fungicidas

En este estudio se utilizaron formulaciones comerciales de BRAVO 720 SA, AMISTAR 50 WG, FLINT, Tilt 250 CE, SCORE 250 CE, ALTO 100 SL, TECTO 60 PH, FOLPAN, VERANGO, LUNA EXPERIENCE, LUNA SENSATION, HIDROMET, TRIMET, COMET, RIDOMIL GOLD 480 SL, BUSAN 30 WB y FOLICUR. Las concentraciones evaluadas de los fungicidas se basaron en el ingrediente activo.

### 5.2.3 Preparación de medios con fungicidas para determinar la ventana biológica

Medio de cultivo PDA (Bioxon) fue preparado en matraces de 250ml, esterilizado (15 minutos a 15 lb) y dejado enfriar. Cuando los medios de cultivo alcanzaron una temperatura de aproximadamente

50°C fue adicionado con fungicidas Triazoles (Propiconazol, Difeconazol, Ciproconazol y Tebuconazol), Inorganicos (Hidróxido cúprico, Sulfato de cobre 500, Sulfato de Cobre 250), Estrobirulinas (Azoxystrobin y Triflocistrobin), Benzamidazoles (Tiabendazol y TCMTB), Cloronitrilos (Clorotalonil), Ftalamidas (Folped), Phenylamidas (Metalaxil), Piridiniletibenzamidas (Fluopyram), Piridiniletibenzamidas + Triazoles (Fluopyram + Tebuconazole), Piridiniletibenzamidas + Estrobirulinas (Fluopyram + Trifloxistrobin), cada uno de ellos a las siguientes concentraciones finales en el medio: 0.0, 0.1, 1, 10, 50, 100 y 500 ppm. Los testigos fueron cajas de Petri con medio PDA sin fungicida. Todas las cajas con el medio y fungicida se prepararon 24 h antes de usarlas en la prueba y se mantuvieron en oscuridad continua en condiciones del laboratorio. Finalmente las cajas con medio fueron previamente etiquetadas e inoculadas en el centro con un disco de 5 mm de diámetro con medio de cultivo y micelio de cada aislamiento, el cual fue obtenido de una colonia cultivada de 8 días a 28 °C en medio de cultivo PDA.

#### **5.2.4 Análisis de datos para la ventana biológica**

De cada cultivo monospórico se colocaron tres cajas con fungicida por concentración y se incubaron a 28 °C en la oscuridad. 10 días después se midió el diámetro de crecimiento de la colonia del hongo en dos orientaciones. Con el porcentaje de inhibición de la colonia del tratamiento y la del testigo se calculó la eficacia del producto mediante la fórmula de Abbott (1925). Para este ensayo se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado y con los valores del diámetro se procedió a determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC), mediante la fórmula siguiente:

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crecimiento Testigo} - \text{Crecimiento Tratamiento}}{\text{Crecimiento Testigo}} \times 100$$

El resultado fue sometido a un análisis Probit para la estimación de la concentración letal media (CL50), concentración letal 95 (CL95) en SAS®.

Una vez que se determinó la ventana biológica, se decidió que productos a utilizar, que concentraciones y que aislados considerar, en base al efecto proporcionado sobre los aislados de *Colletotrichum* de prueba.

### **5.2.5 Preparación de medios con fungicidas para determinar la prueba de sensibilidad**

Medio de cultivo PDA (Difco™) fue preparado en matraces de 250ml, esterilizado (15 minutos a 15 lb) y dejado enfriar. Cuando los medios de cultivo alcanzaron una temperatura de aproximadamente 50°C fue adicionado con fungicidas Tiabendazol a 0.1, 0.5, 1.5, 10, 100, 500 y 750 ppm, Tebuconazol a 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1.5, 10, 100, 250 y 500 ppm y Propiconazol a 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1.5, 10, 50, 100 ppm.

### **5.2.6 Aislados utilizados**

Se emplearon treinta aislados de *Colletotrichum* spp., los cuales fueron identificados, caracterizados patogénica, morfológica y molecularmente mediante análisis de secuencias por la técnica molecular ITS, Los aislados fueron obtenidos a partir de frutos sintomáticos de la enfermedad y se recolectaron de los principales huertos productores de aguacate de los estados de Michoacán, Morelos, Nayarit, México, Puebla y Jalisco, mediante muestreos realizados de enero a agosto 2013.. Los aislados utilizados fueron seleccionados en base a su virulencia en frutos de aguacate cv Hass, inoculados sin herida (Cuadro 2). Los cuales fueron inoculados en las cajas con las concentraciones de los fungicidas, como se mencionó anteriormente.

**Cuadro 2.** Relación de los aislados de *Colletotrichum* spp., localidad, ubicación GPS, msnm, fungicidas aplicados en campo y especie obtenidas utilizados para determinar la sensibilidad in vitro a thiabendazol, propiconazol y tebuconazol.

Aislado	Localidad	Ubicación GPS	msnm	Fungicidas	Especie
MichUru8	Michoacán, Uruapan	N 19° 42' 07" - O 102° 06' 50"	1500	Cobres y tiabendazol	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MichArio10	Michoacán, Ario de Rosales	N 19° 20' 65" - O 101° 70' 37"	1650	Cobres, Azufre humectante,	<i>Colletotrichum kahawae</i>
MichUru5	Michoacán, Uruapan	N 19° 42' 07" - O 102° 06' 50"	1500	Cobres y tiabendazol	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MichUru6	Michoacán, Uruapan	N 19° 42' 07" - O 102° 06' 50"	1500	Cobres	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MichArio11	Michoacán, Ario de Rosales	N 19° 20' 65" - O 101° 70' 37"	1650	Cobres, Azufre humectante,	<i>Colletotrichum simmondsii</i>
MorOcuí57	Morelos, Ocuítuco	N 18° 93' 50" - O 98° 81' 25"	2040	Hidróxido de Cobre, Oxiduro de Cobre, Sulfato de Cobre	<i>Glomerella cingulata</i>
MorYecapix83	Morelos, Yecapixtla	N 18° 87' 03" - O 99° 90' 16"	1580	Folpet, Azoxistrobin, Benomilo	<i>Colletotrichum jasmini</i>
MorTetela75	Morelos, Tetela del Volcan	N 18° 93' 50" - O 98° 81' 25"	2010	Cobres y Caldo Bordeles	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MorYecapix82	Morelos, Yecapixtla	N 18° 87' 03" - O 99° 90' 16"	2102	Folpet, Azoxistrobin, Benomilo	<i>Colletotrichum aenigma</i>
MorYecapix81	Morelos, Yecapixtla	N 18° 87' 03" - O 99° 90' 16"	2102	Folpet, Azoxistrobin, Benomilo	<i>Colletotrichum aenigma</i>
NayTepic127	Nayarit, Tepic	N 21° 40' - O 104° 53'	927	Sin fungicidas	<i>Colletotrichum alienum</i>
NayXalis112	Nayarit, Xalisco	N 24° 44' - O 104° 89'	1 064	Sin fungicidas	<i>Colletotrichum aenigma</i>
NayTepic126	Nayarit, Tepic	N 21° 40' - O 104° 53'	927	Sin fungicidas	<i>Glomerella cingulata</i>
NayTepic124	Nayarit, Tepic	N 21° 40' - O 104° 53'	927	Sin fungicidas	<i>Glomerella cingulata</i>
NayTepic125	Nayarit, Tepic	N 21° 40' - O 104° 53'	927	Sin fungicidas	<i>Colletotrichum alienum</i>
MexCoateH152	México, Coatepec de Harinas	N 18° 92' 49" - O 99° 77' 30"	2200	Cobres, Benomilo, Captan, Benlate	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MexAlmolA157	México, Almoloya de Alquisiras	N 18° 90' 54" - O 99° 92' 82"	1749	Sin fungicidas	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MexAlmolA156	México, Almoloya de Alquisiras	N 18° 90' 54" - O 99° 92' 82"	1750	Sin fungicidas	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MexVillaGro162	México, Villa Guerrero	N 18° 96' 00" - O 99° 63' 99"	1800	Sin fungicidas	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
MexVillaGro160	México, Villa Guerrero	N 18° 96' 00" - O 99° 63' 99"	1800	Sin fungicidas	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
PueZacapal209	Puebla, Zacapala	N 18° 58' 65" - O 98° 06' 72"	1700	Oxiduro de cobre + captan + mancozeb	<i>Colletotrichum jasmini</i>
PueAtlix192	Puebla, Atlixco	N 18° 92' 07" - O 98° 53' 56"	1820	Oxiduro de cobre + captan + mancozeb	<i>Glomerella cingulata</i>
PueTepexi219	Puebla, Tepexi de Rodríguez	N 18° 61' 66" - O 97° 90' 75"	1800	Oxiduro de cobre + captan + mancozeb	<i>Colletotrichum aenigma</i>
PueZacapal208	Puebla, Zacapala	N 18° 58' 65" - O 98° 06' 72"	1700	Oxiduro de cobre + captan + mancozeb	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
PueAtlix196	Puebla, Atlixco	N 18° 92' 07" - O 98° 53' 56"	1820	Oxiduro de cobre	<i>Glomerella cingulata</i>
JalZapot258	Jalisco, Zapotlan	N 19° 70' 39" - O 103° 46' 47"	1720	Cobres	<i>Glomerella cingulata</i>
JalTux276	Jalisco, Tuxpan	N 19° 55' 39" - O 103° 37' 60"	1045	Tribasico de cobre	<i>Glomerella cingulata</i>
JalZapotil279	Jalisco, Zapotiltic	N 19° 63' 00" - O 103° 41' 91"	1366	Oxiduro de cobre	<i>Glomerella cingulata</i>
JalTux275	Jalisco, Tuxpan	N 19° 55' 39" - O 103° 37' 60"	1045	Benomilo	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
JalTux272	Jalisco, Tuxpan	N 19° 55' 39" - O 103° 37' 60"	1045	Clortalonil	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
JalSayula286	Jalisco, Sayula	N 19° 87' 79" - O 103° 56' 65"	1300	Sin fungicidas	<i>Colletotrichum alienum</i>

De cada aislado se colocaron tres cajas con fungicida por concentración y testigo, los cuales se incubaron a 28 °C en la oscuridad. Una vez que el testigo lleno la caja en aproximadamente 10 días después, se midió el diámetro de crecimiento de los diferentes tratamientos. Con el diámetro de crecimiento de la colonia del tratamiento y la del testigo se calculó la eficacia del producto mediante la fórmula de Abbott (1925). El diámetro de crecimiento de la colonia fue sometido a un análisis Probit para la estimación de la concentración letal media (CL50), concentración letal 95 (CL95) en SAS®.

### **5.2.7 Análisis de datos para la prueba de sensibilidad**

El diseño experimental fue completamente al azar. La concentración efectiva 95 % (CE<sub>95</sub>), concentración efectiva 50 % (CE<sub>50</sub>) y límites de confianza (LC) se determinaron mediante el procedimiento Probit (SAS 9.0). La proporción de resistencia se obtuvo al dividir el valor de la CE<sub>95</sub> de cada cepa fungosa con la del aislamiento sensible de *Colletotrichum*. La respuesta fue significativamente diferente cuando los LC al 95 % no presentaron traslape

## 5.3 Resultados y discusión

### 5.3.1 Respuesta al Tiabendazol

La concentración efectiva 50% (CE<sub>50</sub>) que presentó *Colletotrichum* spp. a tiabendazole fue de 0.0713 a 1063 mg L<sup>-1</sup> y la CE<sub>95</sub> de 0.4583 a 7512 mg L<sup>-1</sup>. Gutiérrez-Alonso *et al* (2003). Determino que aislados con valores de DL50 >0.010, 1.158 y 3.246 ppm se pueden considerar como resistentes a thiabendazol. Los aislados que presentaron la mayor CE<sub>95</sub> fueron JalTux279 y JalTux276 con valores de 6429 y 7512 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, ambos aislados correspondieron a *Glomerella cingulata*. Los aislados con mayor sensibilidad fueron MexVillaGro162, MexCoatH152, MichUro6, MorTetela75, MexAlmolA157 correspondientes a *C. gloeosporoides*; así como NayTepic124 y NayTepic126 de *G. cingulata*. Lo actual coincide por lo reportado por Astua (1994) al mencionar una marcada reducción en la sensibilidad al thiabendazol en aislados de *C. gloeosporioides* provenientes de plantaciones de papayas donde el uso de benomyl ha sido intensivo. Benomyl y tiabendazol son fungicidas pertenecientes al grupo de los benzimidazoles, con un mecanismo de acción similar (Davidse e Ishii, 1995). Griffe, 1973 y Quimio, 1976 informan casos de tolerancia a otros benzimidazoles como el benomyl para *Colletotrichum musae*.

Los aislados que no presentaron diferencias significativas con respecto al aislamiento susceptible fueron PueZacapal208, MexVillaGro160 y MexAlmolA156 identificados como *C. gloeosporoides*, y MichoArio10 como *C. kahawae*. La mayor proporción de resistencia (PR) a nivel de CE<sub>95</sub> se observó en dos aislados del estado de Jalisco (JalTux276 y JalZapotil279) (>500 x). De igual manera se observa que los aislados MichArio11, MorYecapix83, PueZacapal209 correspondientes a *C. jasmini*; PueAtlix192 identificado como *G. cingulata* y JalTux275 registrado como *C. gloeosporoides* donde se aplica combinación de productos como cobres, azufre humectante, folpet, azoxistrobin,

benomilo, y mezclas de cobres + captan + mancozeb presentaron alta proporción de resistencia al 95% con valores de 186.89x, 37.1827x, 39.998x, 134.20x y 66.381x, respectivamente. Entre los aislados de *C. gloeosporioides* se observaron diferentes valores de CE<sub>95</sub>, lo cual sugiere variación en los niveles de resistencia a tiabendazol (Cuadro 3). Resultados similares han sido reportados por Freeman y Nizami (1977) para *C. acutatum* en fresa. Lo cual coincide con Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003 al evaluar thiabendazol en aislados de *C. gloeosporioides* de mango. De acuerdo con estos valores, en los aislados MichUru8 y MichUru5 donde se aplicó thiabendazol pueden considerarse como resistentes, mientras que en aislados que recibieron fungicidas en base de cobre fueron sensibles (Cuadro 3). Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003, menciona haber obtenido aislados de Michoacán resistentes a tiabendazol por manifestar TCM mayor a 0.5 mm/día en PDA con 50 ppm. Dekker, 1988 menciona que la determinación y medición de la resistencia a fungicidas en hongos fitopatógenos debe realizarse a través de métodos fáciles y reproducibles. Esta prueba de sensibilidad coincide con Lapeyre y Dubois, 1977 al mencionar aislados de *C. musae* resistentes al tiabendazol desde concentraciones de 1, 5, y 50 g / ml del producto. Estudios realizados por Freeman y Nizami (1977), han demostrado que el thiabendazol es un compuesto que requiere una mayor dosis para el control de *Colletotrichum acutatum*, *C. capsici*, y *C. gloeosporioides*, lo cual fue observado con valores para DL<sub>50</sub> entre 1.15 y 2.13 µg/ml, señalado una pérdida de sensibilidad de estos patógenos a este ingrediente activo, lo cual coincide con muchos casos reportados por el thiabendazol específicamente (Hostachy, 1990; Johanson 1992 y Astua, 1994), esto de igual manera se pudo observar en el presente trabajo.



**Cuadro 3.** Sensibilidad al fungicida tiabendazol de aislados de *Colletotrichum* spp. recolectados en Michoacán, Morelos, edo. de México, Puebla, Nayarit y Jalisco.

Aislado	b ± EE <sup>¶</sup>	CE <sub>50</sub> (ppm)	CE <sub>95</sub> (ppm)	p > x <sup>2</sup> <sub>†</sub>	PR <sub>50</sub>	PR <sub>95</sub>
MichUru8	0.55 ± 0.04	0.1584 (0.0741 - 0.2868)	148.65 (73.266 - 378.79)	<.0001	0.2388	11.6390
MichArio10	0.87 ± 0.69	0.2731 (0.1754 - 0.3946)	20.907 (12.853 - 39.129)	<.0001	0.4117	1.6369
MichUru5	0.51 ± 0.04	0.1920 (0.0882 - 0.3523)	297.33 (136.26 - 844.22)	<.0001	0.1387	23.2803
MichUru6	4.21 ± 0.41	0.3212 (0.2724 - 0.3677)	0.7894 (0.6814 - 0.9535)	<.0001	0.4843	0.0618
MichArio11	0.31 ± 0.03	13.4656 (6.923 - 26.831)	2387 (2369 - 8541)	<.0001	20.303	186.89
MorOcui57	0.46 ± 0.03	0.9029 (0.4798 - 1.5280)	3057 (1137 - 1165)	<.0001	1.3614	2.3935
MorYecapix83	0.46 ± 0.04	0.1278 (0.0495 - 0.2608)	474.887 (195.17 - 1615)	<.0001	0.1927	37.1827
MorTetela75	3.54 ± 0.29	0.2807 (0.2406 - 0.3227)	0.8162 (0.6866 - 0.0146)	<.0001	0.4232	0.0639
MorYecapix82	0.59 ± 0.05	0.0713 (0.0298 - 0.1373)	42.790 (22.428 - 101.04)	<.0001	0.1075	3.3503
MorYecapix81	0.52 ± 0.04	0.1517 (0.0676 - 0.2829)	209.36 (97.486 - 584.65)	<.0001	0.2287	16.3924
NayTepic127	0.55 ± 0.04	0.2047 (0.1004 - 0.3599)	184.56 (90.607 - 471.27)	<.0001	0.3086	14.4506
NayXalis112	0.56 ± 0.04	0.3272 (0.1745 - 0.5455)	251.97 (123.98 - 637.11)	<.0001	0.4932	19.7287
NayTepic126	4.52 ± 0.38	0.2344 (0.2026 - 0.2595)	0.5411 (0.4570 - 0.6685)	<.0001	0.3534	0.0423
NayTepic124	4.36 ± 0.37	0.2188 (0.1896 - 0.2520)	0.5209 (0.4360 - 0.6529)	<.0001	0.3299	0.0407
NayTepic125	0.64 ± 0.04	0.4797 (0.2870 - 0.7401)	170.38 (91.175 - 379.04)	<.0001	0.7233	13.3404
MexCoateH152	6.80 ± 0.03	0.2624 (0.2013 - 0.3134)	0.4578 (0.3905 - 0.5482)	<.0001	0.3956	0.0358
MexAlmolA157	3.26 ± 0.26	0.2259 (0.1925 - 0.2621)	0.7206 (0.5957 - 0.9159)	<.0001	0.3406	0.0564
MexAlmolA156	0.70 ± 0.05	0.1515 (0.0810 - 0.2489)	33.165 (18.956 - 68.424)	<.0001	0.2284	2.5967
MexVillaGro162	6.87 ± 1.09	0.2640 (0.1996 - 0.3163)	0.4583 (0.3907 - 0.5478)	<.0001	0.3980	0.0358
MexVillaGro160	0.77 ± 0.06	0.2195 (0.1296 - 0.3368)	29.575 (17.477 - 58.300)	<.0001	0.3309	2.3156
PueZacapal209	0.56 ± 0.04	0.6219 (0.3565 - 0.9932)	510.85 (243.966 - 1336)	<.0001	0.9377	39.998
PueAtlix192	0.32 ± 0.03	0.1563 (0.0427 - 0.3876)	1714 (3480 - 1999)	<.0001	0.2356	134.20
PueTepexi219	0.54 ± 0.04	0.1339 (0.0601 - 0.2486)	137.99 (67.583 - 356.05)	<.0001	0.2018	10.804
PueZacapal208	0.77 ± 0.06	0.2385 (0.1428 - 0.3631)	32.203 (19.062 - 63.076)	<.0001	0.3596	2.521
PueAtlix196	0.62 ± 0.04	0.5048 (0.2980 - 0.7871)	222.48 (115.97 - 513.58)	<.0001	0.7711	17.419
JalZapot258	0.65 ± 0.05	0.1646 (0.0862 - 0.2748)	51.2069 (28.285 - 110.67)	<.0001	0.2481	4.009
JalTux276	0.88 ± 0.09	1063 (687.047 - 1897)	7512 (2646 - 3483)	<.0001	1602.83	588.17
JalZapotil279	0.54 ± 0.04	65.593 (42.853 - 105.82)	6429 (2145 - 2732)	<.0001	98.9037	503.37
JalTux275	1.17 ± 0.06	33.930 (26.520 - 43.763)	847.801 (553.551 - 1420)	<.0001	51.1610	66.381
JalTux272	0.53 ± 0.04	0.2181 (0.1047 - 0.3894)	269.610 (126.93 - 732.43)	<.0001	0.3288	21.109
Susceptible	1.28 ± 0.09	0.6632 (0.5134 - 0.8371)	12.7717 (8.6810 - 21.04)	<.0001	-	-

b = valor de la pendiente; ¶ = Error estandar de la pendiente; † = Probabilidad de que la línea log Dosis – probar ajuste a una línea recta

### 5.3.2 Respuesta al Propiconazol

Los valores CE<sub>50</sub> en propiconazol variaron de 0.0173 a 1.4248 mg L<sup>-1</sup> y los de CE<sub>95</sub> de 0.1350 a 91.055 mg L<sup>-1</sup>. Los aislados MichArio11, AlmolA156, MexVillaGro160, JalTux275 identificados como *C. gloeosporoides*; y MorOcui57, MorYecapix81, NayTepic125, PueZacapal209,

correspondientes a *G. cingulata*, *C. aenigma*, *C. alienum* y *C. jasmini*, respectivamente presentaron la mayor CE<sub>95</sub> con valores de 27.966 a 91.055 mg L<sup>-1</sup>. Por el contrario, los aislados con mayor sensibilidad fueron MorYecax82, NayXalis112 (*C. aenigma*), MexCoatH152, PueZacapal208, JalTux272 (*C. gloeosporoides*), JalZapol258 y JalTux276 (*G. cingulata*). Por otra parte, existió superposición de los LC a 95 % de inhibición de crecimiento de los aislados MicUru6, MexCoateH152, MexVillaGro160 correspondientes a *C. gloeosporoides*; NayTepic126 y NayTepic124 identificados como *G. cingulata*; NayXalis112 identificada como *C. aenigma* y MichArio10 correspondiente a *C. kahawae*, por lo cual se consideraron estadísticamente iguales con relación al aislamiento susceptible. Los valores más altos de PR a nivel de CE<sub>95</sub> se observó en los aislados MichArio11, Almola156, MorOcui57, MorYecapix81 y NayTepic125 (> 20x). Con respecto a los aislados de *C. gloeosporoides* estos presentaron bajos niveles de PR<sub>95</sub> los cuales fueron menores a 15.00x, a excepción del aislamiento MexAlmola156 (Cuadro 4). Por otro lado en este estudio se observó inhibición del 100% a partir de 0.5 ppm, Wong and Midland, 2007, mencionaron valores de 50% eficaces dosis (ED50) de Propiconazol para control de la población estos datos variaron de 0,025 a 0,35 g / ml con una media de 0,14 g / ml. Por otro lado Gopinatha *et al.*, 2005 menciona que propiconazol presentó el mayor nivel de inhibición del crecimiento micelial in vitro a concentraciones tan bajas como 0.1 ppm. Knights, 1986 que el fungicida proc. Por otro lado Gopinatha *et al.*, 2005 menciona que propiconazol presentó el mayor nivel de inhibición del crecimiento micelial in vitro a concentraciones tan bajas hloraz del grupo de los propiconazol, inhibidor de la síntesis del ergosterol, ha demostrado su eficacia contra *C. gloeosporioides* en tratamientos postcosecha en aguacate, banano, papaya y mango.

**Cuadro 4.** Sensibilidad al fungicida Propiconazol de aislados de *Colletotrichum* spp. recolectados en Michoacán, Morelos, edo. de México, Puebla, Nayarit y Jalisco.

Aislado	b ± EE <sup>¶</sup>	CE <sub>50</sub> (ppm)	CE <sub>95</sub> (ppm)	p > x <sup>2</sup> †	PR <sub>50</sub>	PR <sub>95</sub>
MichUru8	1.11 ± 0.07	0.3207 (0.2433 - 0.4136)	9.5332 (6.4397 - 15.472)	<.0001	2.4185	3.420
MichArio10	0.82 ± 0.06	0.0708 (0.0465 - 0.1018)	6.8048 (4.1240 - 12.798)	<.0001	0.5339	2.441
MichUru5	1.06 ± 0.06	0.4406 (0.3342 - 0.5697)	15.5445 (10.370 - 25.557)	<.0001	2.547	5.577
MichUru6	1.44 ± 0.10	0.3378 (0.2682 - 0.4195)	4.6528 (3.3192 - 7.0987)	<.0001	2.547	1.669
MichArio11	0.60 ± 0.04	0.1804 (0.1103 - 0.2753)	91.055 (46.460 - 215.34)	<.0001	32.668	32.66
MorOcui57	0.83 ± 0.05	0.6332 (0.4644 - 0.8482)	58.557 (35.078 - 110.32)	<.0001	21.009	21.00
MorYecapix83	1.09 ± 0.06	0.4876 (0.3745 - 0.6260)	15.548 (10.446 - 25.246)	<.0001	5.578	5.578
MorTetela75	1.22 ± 0.07	0.4550 (0.3549 - 0.5748)	10.006 (6.897 - 15.8502)	<.0001	3.589	3.589
MorYecapix82	2.62 ± 0.25	0.1263 (0.1034 - 0.1508)	0.5361 (0.4197 - 0.7463)	<.0001	0.192	0.192
MorYecapix81	0.91 ± 0.05	0.9155 (0.6941 - 1.1979)	56.558 (35.435 - 99.859)	<.0001	20.292	20.29
NayTepic127	1.10 ± 0.06	0.2932 (0.2233 - 0.3784)	8.982 (6.1124 - 14.3133)	<.0001	3.190	3.222
NayXalis112	0.78 ± 0.05	0.0173(0.0114 - 0.0251)	2.1320 (1.2736 - 3.9922)	<.0001	0.764	0.764
NayTepic126	1.32 ± 0.08	0.1928 (0.1497 - 0.2441)	3.3611 (2.3583 - 5.2081)	<.0001	1.453	1.205
NayTepic124	1.49 ± 0.10	0.2734 (0.2180 - 0.3391)	3.4605 (2.4722 - 5.2686)	<.0001	2.061	1.241
NayTepic125	0.86 ± 0.05	0.9587 (0.7196 - 1.2660)	76.011 (46.231 - 139.59)	<.0001	27.221	27.27
MexCoateH152	1.19 ± 0.07	0.1537 (0.1175 - 0.1978)	3.6709 (2.5135 - 5.8324)	<.0001	1.159	0.161
MexAlmolA157	1.04 ± 0.06	0.4210 (0.3187 - 0.5466)	15.914 (10.735 - 25.565)	<.0001	3.174	5.709
MexAlmolA156	0.88 ± 0.05	0.9743 (0.7294 - 1.2840)	69.064 (43.448 - 121.11)	<.0001	7.347	24.77
MexVillaGro162	1.09 ± 0.06	1.4248 (1.1153 - 1.8062)	45.306 (30.024 - 75.142)	<.0001	10.745	15.25
MexVillaGro160	1.41 ± 0.09	0.3364 (0.2680 - 0.4190)	4.8548 (3.4418 - 7.4173)	<.0001	2.536	1.741
PueZacapal209	0.85 ± 0.04	0.4023 (0.2954 - 0.5384)	34.152 (21.328 - 60.280)	<.0001	3.033	12.25
PueAtlix192	1.01 ± 0.05	0.3769 (0.2864 - 0.4899)	15.779 (10.409 - 26.053)	<.0001	2.842	5.661
PueTepexi219	1.74 ± 0.12	0.9998 (0.8282 - 1.2007)	8.798 (6.5089 - 12.8714)	<.0001	7.539	3.156
PueZacapal208	1.58 ± 0.11	0.1013 (0.0789 - 0.1275)	1.1140 (0.8101 - 1.6554)	<.0001	0.767	0.399
PueAtlix196	1.84 ± 0.07	0.5198 (0.4043 - 0.6588)	12.727 (8.767 - 20.0799)	<.0001	3.920	4.566
JalZapot258	1.83 ± 0.14	0.1448 (0.1150 - 0.1780)	1.1435 (0.8535 - 1.6660)	<.0001	1.092	0.410
JalTux276	11.95 ± 32	0.1255 (-)	0.1723 (-)	<.0001	0.9464	0.061
JalZapotil279	0.94 ± 0.05	0.1230 (0.0896 - 0.1652)	6.865 (4.4926 - 11.3956)	<.0001	0.927	2.463
JalTux275	1.06 ± 0.06	0.7867 (0.6060 - 1.0082)	27.966 (18.678 - 45.709)	<.0001	5.932	10.033
JalTux272	9.51 ± 2168	0.0907 (-)	0.1350 (-)	<.0001	0.684	0.048
Susceptible	1.24 ± 0.07	0.1326 (0.1017 - 0.1703)	2.7872 (1.927 - 4.374)	<.0001	-	-

b = valor de la pendiente; ¶ = Error estandar de la pendiente; † = Probabilidad de que la línea log Dosis – probar ajuste a una línea recta

### 5.3.3 Respuesta al Tebuconazol

Los valores de  $CE_{50}$  para los aislados de *Colletotrichum* spp., fluctuaron entre 0.0522 a 8.0719  $mg L^{-1}$  y los de  $CE_{95}$  de 4.4531  $mg L^{-1}$  a 1034  $mg L^{-1}$ . Algo similar fue reportado por Wong and Midland, 2007, al mencionar una  $DE_{50}$  de 0.72, 0.082 y 5.6 g/ml para tebuconazol necesarios para la inhibición de *Colletotrichum cereale* (antracnosis césped). Los aislados que presentaron valores de  $CE_{95}$  menores al aislados susceptible fueron MichUru6, MexVillaGro162, PueZacapal208 identificados como *C. gloeosporoides*; NayTepic124, JalZapol258, JalTux276 correspondientes a *G. cingulata*; MorYecapix82 caracterizado como *C. aenigma* y MichArio10 correspondiente a *C. kahawae*. Los aislados PueZacapal209 (*C. jasmini*) y MicUru5 (*C. gloeosporoides*) presentaron la mayor  $CE_{95}$ , con valores de 931.66 y 1034.00  $mg L^{-1}$ , respectivamente. Se registró superposición de los límites de confianza al 95 % de inhibición del crecimiento entre el aislamiento susceptible y MichUru6, MexCoatH152, MichAmolA157, MexVillaGro162, PueZacapal208, JalTux276, NayTepic124, NayTepic126 (*G. cingulata*), NayXalis112 (*C. aenigma*) y MichArio10 (*C. kahawae*), por lo cual se consideró que no existe diferencias estadística entre estos aislados y el sensible. La PR a nivel  $CE_{95}$  entre el aislamiento sensible y los más tolerantes fue de 34.419 a 43.796x, correspondiente a los aislados PueZacapal209 y MichUru5 (Cuadro 5). Nelson D. menciona que para tener una eficiencia de  $ED_{50}$  por tebuconazol, son necesarios valores bajos y variados 0,020 a 0,191 y desde 0,019 hasta 0,068 g ai / mL, respectivamente, para proporcionar un buen efecto contra el patógeno.

**Cuadro 5.** Sensibilidad al fungicida Tebuconazol de aislados de *Colletotrichum* spp. colectados en Michoacán, Morelos, edo. de México, Puebla, Nayarit y Jalisco.

Aislado	b ± EE <sup>¶</sup>	CE <sub>50</sub> (ppm)	CE <sub>95</sub> (ppm)	p > x <sup>2</sup> †	PR <sub>50</sub>	PR <sub>95</sub>
MichUru8	0.98 ± 0.05	4.7805 (3.6893 - 6.2017)	223.38(142.89 – 381.37)	<.0001	5.224	0.1474
MichArio10	0.63 ± 0.03	0.0522 (0.0337 - 0.0775)	21.114 (11.586 - 43.711)	<.0001	0.057	0.8943
MichUru5	0.75 ± 0.04	7.0114 (5.1757 – 9.5378)	1034 (581.33 - 2069)	<.0001	7.661	43.7968
MichUru6	2.13 ± 0.16	4.7884 (4.0490 - 5.7067)	28.315 (20.890 - 42.251)	<.0001	5.232	1.1993
MichArio11	1.07 ± 0.06	0.1327 (0.0982 - 0.1749)	4.4531 (3.0067 - 7.1742)	<.0001	0.145	0.1886
MorOcui57	0.62 ± 0.03	0.7696 (0.5369 - 1.0906)	327.98 (173.60 - 706.44)	<.0001	0.841	13.8921
MorYecapix83	0.97 ± 0.05	1.6948 (1.3013 - 2.2017)	82.396 (52.545 - 141.73)	<.0001	1.852	3.4900
MorTetela75	0.87 ± 0.04	2.3340 (1.7660 - 3.0867)	177.46 (108.10 - 321.81)	<.0001	2.550	7.5194
MorYecapix82	2.04 ± 0.15	0.8039 (0.6781 - 0.9538)	5.1165 (3.8329 - 7.4316)	<.0001	0.8784	0.2168
MorYecapix81	0.85 ± 0.04	3.0237 (2.2810 - 4.0141)	255.37 (153.16 - 472.46)	<.0001	3.3042	10.8166
NayTepic127	1.01 ± 0.05	3.3046 (2.5636 - 4.2610)	135.52 (87.39 - 229.926)	<.0001	3.6111	5.7401
NayXalis112	0.83 ± 0.04	0.3387 (0.2478 - 0.4560)	31.082 (19.075 - 56.076)	<.0001	0.3701	1.3165
NayTepic126	1.55 ± 0.10	2.2862 (1.8782 - 2.7919)	26.125 (18.311 - 41.045)	<.0001	2.4983	1.1065
NayTepic124	2.27 ± 0.17	3.4894 (2.9760 - 4.1059)	18.390 (14.002 - 26.201)	<.0001	3.8131	0.7789
NayTepic125	0.83 ± 0.04	2.7501 (2.0670 - 3.6621)	250.27 (150.12 - 461.90)	<.0001	3.0050	10.6006
MexCoateH152	1.08 ± 0.06	1.4474 (1.1302 - 1.8478)	47.039 (30.653 - 79.605)	<.0001	1.5816	1.9924
MexAlmolA157	1.23 ± 0.07	1.3179 (1.0476 - 1.6575)	28.341 (19.038 - 46.321)	<.0001	1.4401	1.2004
MexAlmolA156	0.90 ± 0.04	2.472 (1.8783 – 3.2485)	161.99 (101.20 - 284.39)	<.0001	2.7013	6.8613
MexVillaGro162	0.91 ± 0.05	3.0424 (2.3214 - 3.9883)	193.10 (119.34 - 344.94)	<.0001	3.3246	8.1790
MexVillaGro160	0.75 ± 0.04	2.0242 (1.4897 - 2.7493)	310.45 (177.10 - 609.71)	<.0001	2.2119	13.1496
PueZacapal209	0.63 ± 0.03	2.4471 (1.7385 - 3.4458)	931.66 (479.88 - 2080)	<.0001	2.6741	34.4197
PueAtlix192	0.91 ± 0.04	3.3946 (2.5843 - 4.4482)	215.28 (135.19 - 375.77)	<.0001	3.7095	9.1185
PueTepexi219	1.54 ± 0.10	1.9717 (1.6169 - 2.4163)	22.903 (16.061 - 35.779)	<.0001	2.1546	0.9700
PueZacapal208	0.77 ± 0.04	0.3516 (0.2549 - 0.4794)	45.733 (27.251 - 85.031)	<.0001	0.3842	1.9371
PueAtlix196	2.14 ± 0.15	1.1982 (1.0166 - 1.4160)	6.9767 (5.3082 - 9.8746)	<.0001	1.3093	0.2955
JalZapot258	2.14 ± 0.15	1.1982 (1.0166 - 1.4160)	6.9767 (5.3082 - 9.8746)	<.0001	1.3093	0.2955
JalTux276	1.30 ± 0.08	1.1969 (0.9592 - 1.4924)	21.765(14.749 - 35.415)	<.0001	1.3079	0.9218
JalZapotil279	1.25 ± 0.07	4.6702 (3.7096 - 5.8599)	95.237 (66.444 - 146.66)	<.0001	5.1034	4.0339
JalTux275	1.51 ± 0.09	8.0719 (6.5573 - 9.9488)	99.081 (70.737 - 149.55)	<.0001	8.8207	4.1967
JalTux272	0.94 ± 0.05	2.4446 (1.8728 - 3.1992)	134.261 (84.02 - 235.47)	<.0001	2.6714	5.6868
Susceptible	1.16 ± 0.07	0.9151 (0.7169 - 1.1590)	23.609 (15.795 - 38.821)	<.0001	-	-

b = valor de la pendiente; ¶ = Error estandar de la pendiente; † = Probabilidad de que la línea log Dosis – probar ajuste a una línea recta

Existe la probabilidad elevada de que existan individuos resistentes en las poblaciones originales, incluso antes de ser expuestas a la acción de los fungicidas, debido a que estos se encuentran de forma natural en frecuencias bajas (uno en un millón o menos) dentro de la población de un patógeno (Damicone, 2000). Yang y TeBeest (1995) encontraron evidencia de que en ausencia de la presión de selección ejercida por fungicidas, los aislados sensibles de *Colletotrichum* compiten mejor que aislados resistentes a benomil del grupo de los benzimidazoles.

#### **5.4 Conclusiones**

Los aislados de *Colletotrichum* spp., presentaron diferentes valores en los límites de confianza CE<sub>50</sub> y CE<sub>95</sub> y en las proporciones de los resistencia al 95% (PR<sub>95</sub>), lo cual sugiere variación en los niveles de resistencia a los fungicidas Tiabendazol, Propiconazol y Tebuconazol evaluados.

La prueba de sensibilidad a los fungicidas Propiconazol y Tebuconazol mostraron que *Colletotrichum* spp., causantes de la antracnosis del aguacate son sensibles a esta clase de productos.

El uso de Tiabendazol, así como de otros benzimidazoles, debe reducirse o eliminarse en la aplicación del producto al cultivo del aguacate, ya que su efectividad ha disminuido a la presencia de poblaciones de *Colletotrichum* resistentes a estos fungicidas, ya que en la reducción del uso de benzimidazoles podría disminuir la proporción de aislados resistentes y el predominio eventual de aislados sensibles.

## 5.5 Literatura citada

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- Alahakoon, P.W., Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E., and Millis, P.R. 1992. Selection of a genetic variant within *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic on mango by passaging through wounded tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41:227-240.
- Anesiadis, T., Karaoglanidis, R., and Klonari, K.T. 2003. Protective, curative and eradicator activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. *Journal of Phytopathology* 151: 647-651.
- Astua, G.; Arauz, L.F.; y Uniaña G. 1994. Sensibilidad reducida al thiabendazol en *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de papaya. *Agronomía Costarricense* 18(1):35-39.
- Battle A. y Giselle E. 2000. Actividad fungicida de triazoles y benzimidazoles sobre *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en la fase de postcosecha de frutabomba (*Carica papaya* L.). *Fitosanidad* Vol. 4, no. 1-2.
- Becerra-Leor, E.N. 1995. Enfermedades del cultivo de mango. pp.83-101. En: I. Mata- Beltran y R. Mosqueda-Vázquez (eds.). *La producción de mango en México*. Noriega Editores. México, D.F.
- Brent, K. J., and Hollomon, D.W. 1998. Fungicides resistance: How can it be managed? Global Crop Protection Federation. Global Crop Protection Federation and Fungicides Resistance Action Committee. Monograph No. 2. United Kingdom. 48p.
- Chakravarty, T. 1957. Anthracnose of banana (*Gloeosporium musarum* Cke. & Masee) with special reference to latent infection in storage. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 40:337-345.
- Damicone, J. 2000. Fungicide resistance management. Oklahoma Cooperative Extension Service,

Division of Agricultural Science and Natural Resources. OSU Extension. Oklahoma, USA. Facts F-7663. 8 p.

Davidse, L.C.; Ishii, H. 1995. Biochemical and Molecular Aspects of the Mechanisms of Action of Benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoxines and the Mechanisms of Resistance to These Compounds in Fungi. Modern Selective Fungicides. Ed. Dr. Horst Lyr. 302-322.

Dekker, J. 1977. Resistance. Pp. 176-197. In: R.W. Marsh (ed.). systemic Fungicides. Logman, London, UK.

Delp, C.J. 1980. Coping with resistance to plant disease control agents. Plant Disease 64:652-657.

FAOSTAT (2005) Producción de alimentos y productos básicos agrícolas [www.fao.org/es/ess/top/country.html?lang=es&country=138&year=2005](http://www.fao.org/es/ess/top/country.html?lang=es&country=138&year=2005).

Fitzell, R. 1979. *C. acutatum* as a cause of anthracnose of mango in New South Wales. Plant Disease Report 63: 1067-1070.

FRAC. 2014. FRAC Code List ©\*2014: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering), en Línea. P. 10. Revisado el 13 de diciembre de 2014. <http://www.frac.info/publication/anhang/2014%20FRAC%20Code%20List.pdf>.

Freeman, S.; y Y. Nizami. 1997. Control of *Colletotrichum acutatum* in Strawberry Under Laboratory, Greenhouse and Field Conditions. Plant Disease 81:749-752.

Gopinatha, K., Radhakrishnana N. V., Jayaraja J. 2006. Effect of propiconazole and difenoconazole on the control of anthracnose of chilli fruits caused by *Colletotrichum capsici*. Crop Protection. Volume 25, Issue 9. Pages 1024–1031.

Georgopoulos, S.G. 1982. Detection and measurement of fungicide resistance. In: J. Dekker, J., S.G. Georgopoulos (eds.). Fungicide resistance in crop protection. Center for Agricultural Publishing and Documentation. Wageningen, Netherlands. pp. 24-31.



- Gutiérrez-Alonso, O., Nieto, A.D., Gutiérrez-Alonso, J.G., Delgadillo, S.F. y Domínguez- Álvarez, J.L. 2002. Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislados de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 20:24-30.
- Gutiérrez, A.O. y Gutiérrez, A.J.G. 2003. Evaluación de resistencia a Benomil, thiabendazol y azoxistrobin para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21(2): 228-232.
- Gutiérrez-Alonso, J.G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F., y Vaquera-Huerta, H. 2003. Resistencia a benomil y tiabendazol en aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en cinco regiones de México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:260-266.
- Gutiérrez, C. M. 2008. Diagnóstico genético y patogénico de *Colletotrichum* spp., en el área aguacatera de Michoacán, México. Universidad Autónoma de Nayarit.
- Griffe, P. J. 1973. Resistance to Benomyl and Related Fungicides in *Colletotrichum musae*, Trans. Br. Mycol. Oc. 60:433-439.
- Jeffries, P., Dodd, J.C., Jefer, M.J., and Plumbley, R.A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology 39:343-366.
- Knights, I.K. 1986. Developments in the use of prochloraz for tropical fruits disease control. In British Crop Protection Conference. Pest and Diseases. Vol. 1. Thornton Heath, U.K; British Crop Protection Council. P. 331-338.
- Lapeyre de B. L., and Dubois, C. 1997. Distribution of thiabendazole-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadeloupe banana plantations. Plant Disease. 81:1378-1383.

- Miles, A.K., Willingham, S.L. and Cooke, A.W. 2004. Field evaluation of strobilurins and a plant activator for the control of citrus black spot. *Australian Plant Pathology* 33: 371-378.
- Meredith, D. S. 1960. Studies on *Gloeosporium musarum* Cke. & Masee causing storage rots of Jamaican bananas. I. Anthracnose and its chemical control. *Annals of Applied Biology*. 48:279- 290.
- Martínez-Bolaños L., Téliz-Ortiz D., Rodríguez-Maciel J. C., Mora-Aguilera J.A, Nieto-Ángel D., Cortés-Flores, J. I., Mejía-Sánchez D., Nava-Díaz C., Silva-Aguayo G. 2012. Fungicides Resistance on *Mycosphaerella fijiensis* Populations of Southeastern Mexico. *Agrociencia* 46: 707-717.
- Muirhead, I. F., and Deverall, B. J. 1981. Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. *Physiology Plant Pathology*. 19:77-84.
- Nelson D. Suassuna, Joel A. Queiroz, Aldenise B. de Oliveira, Luiz A. Maffia, Eduardo S. G. Mizubuti. Sensitivity of *colletotrichum gossypii* var. cephalosporioides strains to carbendazim, tebuconazole, and azoxystrobin.
- Nieto, A.D., Gutiérrez, A.J.G., Gutiérrez, A.O., Téliz, O.D, Zavaleta, M.E, Delgadillo, S.F y Vaquiera, H. 2003. Evaluación de resistencia a Imazalil, Prochloraz y Azoxystrobin en aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz y Sacc. y control de la antracnosis del mango. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 379-383.
- Pegg, K.G., Coates, L.M., Korsten, L. y Harding, R.M. 2007. Enfermedades foliares del fruto y suelo. In: El palto. Botánica, Producción y Usos. Whiley, A. W., Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. (eds.). Ediciones Universitarias de Valparaíso. pp: 25-45.
- Slawecki, R.A., Ryan, E.P. and Young, D.H. 2002. Novel fungitoxicity assays for inhibition of germination associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. *Applied Environmental Microbiology* 68:597-601.

- Sánchez PJL, Alcántar RJJ, Coria AVM, Anguiano CJ, Vidales FI, Tapia VLM, Aguilera MJ, Hernández RG, Vidales FJA (2001) Tecnología para la Producción de Aguacate en México. INIFAP. Libro Técnico N° 1. 208 pp.
- Smith CEJr (1966). Archaeological evidence for selection in avocado. *Econ. Bot.* 20: 169-175.
- Téliz, O.D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Ed. Mundi Prensa México, S. A. de C. V. 1a Ed. 219 p.
- Vega, P.A. 1994. Enfermedades del mango (*Mangifera indica* L.) en el valle de Apatzingan, SARH-INIFAP. México. 26p.
- Wong F. P. and Midland S. L. 2007. Sensitivity Distributions of California Populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI Fungicides Propiconazole, Myclobutanil, Tebuconazole, and Triadimefon. Department of Plant Pathology, University of California, Riverside 92521. Volume 91, Number 12. Pages 1547-1555.
- Yang, X. B; Tebeest, D.O. 1995. Competitiveness of mutant and wild-type isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* on norther jointvetch. *Phytopathology* 85:705-710.

## CONCLUSIONES GENERALES

El análisis multivariado y la caracterización morfológica y cultural de los aislamientos conseguidos de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis identificaron a *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum*. La variación morfológica que se observó indicaron la presencia de otras especies.

Los 300 aislamientos fueron más virulentos en el hospedante original que en los hospedantes alternos. Se observó que cuando se provoca una herida se facilita la entrada del patógeno y la infección se ve reflejada en un mayor diámetro de lesión y que las especies obtenidas en esta investigación son capaces de causar la antracnosis en frutos de aguacate y en los cultivos alternos.

En base a las secuencias moleculares se confirmó la presencia de *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), *C. acutatum* (*Glomerella acutata*) y *C. boninense* en frutos de aguacate. Además y por primera vez se presenta evidencia de la presencia de *Colletotrichum simmondsii*, *C. alienum*, *C. kahawae*, *C. aenigma*, *C. jasmini*, *C. fragariae*, *C. higginsianum*, *C. godetiae* y *C. tropicale* en el cultivo de aguacate en México.

En la prueba de sensibilidad a fungicidas tiabendazol, Propiconazol y tebuconazol mostró que las especies de *Colletotrichum* spp., responsables de causar la antracnosis en aguacate son sensibles y resistentes a esta clase de fungicidas. Los valores  $CE_{50}$  en tiabendazol variaron de 0.0713 a 1063 mg L<sup>-1</sup>; y los de  $CE_{95}$  de 0.4583 a 7512 mg L<sup>-1</sup>, indicando la existencia de aislamientos sensibles y resistentes a este producto. Los valores  $CE_{50}$  en Propiconazol variaron de 0.0173 a 1.4248 mg L<sup>-1</sup>; y los de  $CE_{95}$  de 0.1350 a 91.085 mg L<sup>-1</sup>. Observándose los valores más altos de PR a nivel de  $CE_{95}$  en los aislamientos MichArio11, Almola156, MorOcui57, MorYecapix81 y NayTepic125 (> 20x). Los

valores para  $CE_{50}$  en Tebuconazol variaron de 0.0522 a 8.0719 mg L<sup>-1</sup> y los de  $CE_{95}$  de 4.4531 a 1034 mg L<sup>-1</sup>. Siendo los aislados PueZacapal209 y MichUru5 los más tolerantes al aislamiento sensible con valores de 34.419 a 43.796x a la PR a nivel  $CE_{95}$ .