



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y POR ANÁLISIS
MULTILOCUS DE ESPECIES DE *Colletotrichum* EN EL
CULTIVO DE CAFETO EN LA ZONA NORTE DE PUEBLA**

ANA LUISA CRISTÓBAL MARTÍNEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis, titulada: **Identificación morfológica y por análisis multilocus de especies de *Colletotrichum* en el cultivo de cafeto en la zona norte de Puebla**, realizada por la alumna: **Ana Luisa Cristóbal Martínez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dra. María de Jesús Yáñez Morales

**DIRECTOR
DE TESIS**

Dr. Roney Solano Vidal

ASESOR

Dra. Ana María Hernández Anguiano

ASESOR

Dra. Obdulia Lourdes Segura León

RESUMEN GENERAL

Dada la diversidad de enfermedades foliares del cafeto, el objetivo del estudio fue identificar las especies de *Colletotrichum* en síntomas similares a antracnosis en plantaciones de cafeto de la zona norte del estado de Puebla. En 2013 se hicieron cinco muestreos en diferentes zonas de producción y altitudes cultivadas con la variedad Caturra Rojo y donde se colectaron hojas, y frutos verdes y maduros con síntomas de antracnosis, y tallos apicales necrosados. Los síntomas fueron descritos y fotografiados. Se obtuvieron 60 aislamientos de *Colletotrichum* en cultivo agar de tejidos desinfectados. Se seleccionaron 10 aislamientos para su identificación morfológica y caracterización por análisis multilocus principalmente con los genes de Actina, β -tubulina y las regiones ITS. Además pruebas de patogenicidad se condujeron con seis aislamientos. Se identificó a *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense*, *C. theobromicola* y *Colletotrichum* sp. (una posible especie perteneciente al complejo *C. gigasporum*), y todas las cuales fueron patogénicas en hojas de cafeto de la variedad Caturra Rojo y se caracterizaron los síntomas.

Palabras clave: *Colletotrichum*, análisis multilocus, cafeto, patogenicidad, antracnosis.

ABSTRACT

Due to the diversity of foliar diseases affecting coffee plants, the aim of this study was to identify the *Colletotrichum* species with similar anthracnose symptoms in coffee plantations located in the northern state of Puebla. In 2013, five samplings in different production areas and altitudes were carried out, where leaves, ripe and unripe fruits with anthracnose symptoms and necrotic stems of the Red Caturra variety were collected. Isolates of disinfested tissues in agar culture were obtained. Symptoms were described and photographed. *Colletotrichum* 60 isolates were obtained from disinfested tissue on culture agar. Ten isolates were selected for morphological identification and characterization by multilocus analysis with mainly the Actin, β -tubulina genes and ITS regions, additionally; and pathogenicity tests were done with six isolates. The species identified were *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense*, *C. theobromicola* and *Colletotrichum* sp., a possible specie belonging to the complex *C. gigasporum*. All of the species were pathogenic on coffee tree leaves and their symptoms were characterized.

Keywords: *Colletotrichum*, multilocus analysis, coffee tree, pathogenicity, anthracnose.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el financiamiento de mis estudios de Postgrado.

Al **Colegio de Postgraduados**, por permitir realizar mis estudios de maestría y por las facilidades otorgadas.

A la **Dra. María de Jesús Yáñez Morales**, por la gran contribución que hizo a mi formación, por brindarme su apoyo en todo momento y por su invaluable dirección en la realización del presente trabajo.

Al **Dr. Roney Solano Vidal**, por creer en mí, brindarme su apoyo incondicional, por sus consejos y sobre todo por brindarme su amistad.

A la **Dra. Ana María Hernández Anguiano**, por sus atinados consejos y orientación en el desarrollo de la presente investigación

A la **Dra. Obdulia Segura León** por su apoyo y orientación para el desarrollo del presente trabajo y en especial por su amistad.

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

.

Agradezco a mis **amigos y compañeros** del postgrado de Fitopatología, por todos los momentos y experiencias compartidos.

DEDICATORIA

A mi hijo **Luis Armando Anguiano Cristóbal** quien es el motor que me impulsa a seguir adelante cada día. Porque tú cambiaste mi vida y la llenaste de ilusión y alegría, gracias porque con tu llegada pude conocer el amor más puro y sincero.

A mi mamá **María Luisa Martínez Torres**, por que a ti te debo todo lo que soy, por todo el apoyo, amor, dedicación y tiempo que siempre me has brindado, por ser una gran mujer a la que admiro.

A mi esposo **Armando Anguiano Sánchez**, por ser mi amigo, confidente y compañero, por apoyarme en todo momento y en cada decisión que he tomado, y sobre todo por el amor que nos tienes.

A mi hermana **Cecilia Cristóbal Martínez**, por todo tu apoyo, comprensión y cariño que siempre has demostrado tenerme a mí y mi hijo.

A mis abuelitos **Juan Martínez Ramos** y **Luisa Torres Espinoza**, quienes siempre estarán en mi corazón.

A mi familia que ha sido un gran pilar para la culminación de esta investigación.

A mi tía **Martha Angélica Martínez** y mi prima **Angélica Martínez** por su confianza y apoyo en la etapa final de la investigación.

A mis **sobrinos** con cariño

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | I |
| LISTA DE CUADROS | V |
| CAPITULO I. MARCO DE REFERENCIA..... | 1 |
| 1. Introducción general | 1 |
| 2. Objetivos generales | 2 |
| 3. Revisión de literatura | 3 |
| 3.1 Importancia del cultivo del café..... | 3 |
| 3.2 Clasificación..... | 4 |
| 3.3 Descripción botánica..... | 4 |
| 3.4 Enfermedades del café | 5 |
| 3.5 La antracnosis del café | 7 |
| 3.5.1 Sintomatología..... | 9 |
| 3.5.1.1 Hojas | 9 |
| 3.5.1.2 Relación de <i>Colletotrichum</i> con <i>Cercospora</i> en hojas..... | 10 |
| 3.5.1.3 Ramas | 11 |
| 3.5.1.4 Frutos | 12 |
| 3.5.2 Proceso de infección | 12 |
| 3.5.3 Epidemiología..... | 13 |
| 3.5.4 Control | 14 |
| 3.6 Importancia de <i>Colletotrichum</i> | 15 |
| 3.7 Clasificación taxonómica | 16 |
| 3.8 Nomenclatura | 16 |
| 4. Referencias | 19 |
| CAPITULO II. SINTOMATOLOGÍA RELACIONADA CON ANTRACNOSIS Y SU ASOCIACIÓN CON <i>COLLETOTRICHUM</i> EN PLANTACIONES DE CAFÉ EN PUEBLA..... | 27 |
| Resumen..... | 27 |
| Abstract..... | 28 |
| 1. Introducción | 29 |
| 2. Materiales y Métodos..... | 31 |
| 2.1 Colecta de material vegetal con síntomas y selección de aislamientos. | 31 |
| 2.2 Identificación purificación y conservación de aislamientos | 32 |
| 3. Resultados..... | 33 |
| 3.1 Caracterización del material vegetal colectado y seleccionado | 33 |
| 3.2 Características de síntomas de tejidos muestreados | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3 Purificación y conservación de aislamientos..... | 38 |
| 4. Discusión | 40 |
| 5. Conclusiones..... | 42 |
| 6. Referencias | 43 |
| CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y POR ANALISIS MULTILOCUS DE ESPECIES DE COLLETOTRICHUM EN CAFETO | 45 |
| Resumen..... | 45 |
| Abstract..... | 46 |
| 1. Introducción | 47 |
| 2. Materiales y Métodos..... | 49 |
| 2.1 Caracterización cultural y morfológica | 49 |
| 2.2 Características culturales..... | 49 |
| 2.3 Características morfológicas..... | 50 |
| 2.4 Pruebas de patogenicidad | 50 |
| 2.3 Caracterización molecular | 51 |
| 2.2.1 Extracción de DNA | 51 |
| 2.2.2 Amplificación de los genes ITS, β -tubulina y actina | 51 |
| 2.2.3 Análisis filogenético de secuencias | 52 |
| 3. Resultados..... | 53 |
| 3.1 Caracterización morfológica | 53 |
| 3.2 Pruebas de patogenicidad | 62 |
| 3.3 Caracterización molecular | 64 |
| 3.3.1 Análisis filogenético de secuencias | 64 |
| 4. Discusión | 69 |
| 5. Conclusiones | 72 |
| 6. Referencias | 73 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Síntomas de antracnosis reportados por FUNICA (s/a) (página web) en hojas de café. (A) En ápices de hojas, (B - D) En bordes de hojas..... 10
- Figura 2.** Síntoma típico de *Cercospora* en hojas de café caracterizado por Nelson (2008), lesiones concéntricas y con halo amarillo..... 11
- Figura 3.** Síntomas de antracnosis en tejidos de plantas de café en campo. (A) Hojas con círculos concéntricos y halo, (B) Hojas con círculos concéntricos y con área necrótica extendida y halo, (C) Áreas necróticas marginales y sin notorio halo, (D) Frutos verdes con manchas, (E) Frutos maduros con manchas, (F) Frutos 100 % necrosados, (G, H) Tallo de rama apical necrosada, (I) Tallo de rama apical sin hojas y con frutos y tallo necrosado..... 36
- Figura 4.** Colonias monospóricas de *Colletotrichum* de cuatro días de crecimiento en Papa Dextrosa Agar a temperatura ambiente bajo luz nUV. Las colonias se aislaron de plantas de café y son resultado de una pre-selección (screen) de 60 aislamientos para futuros análisis morfológicos y moleculares..... 39
- Figura 5.** Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum gigasporum*. (A) Frente (B) Reverso de una colonia de 7d en PDA a 25 °C, oscuridad continua, (C) Conidios (en contraste de fases), (D) Setas, (E) Apresorios; barra = 20 µm 54
- Figura 6.** Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Frente, (B) Reverso de una colonia; 7d en PDA y condiciones

ambientales de laboratorio, (C) Conidios (en contraste de fases); barra = 15 μm , (D,E,F,G) Apresorios; barra = 5 μm 55

Figura 7. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum* sp. (A) Frente, (B) Reverso de una colonia; 7d en PDA a 25 °C y oscuridad continua, (C) Conidios (en contraste de fases); barra = 20 μm , (D) Setas; barra = 15 μm (E,F,G) Apresorios; barra = 5 μm 57

Figura 8. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum karstii* (A) Frente, (B) Reverso de una colonia de 7d en PDA a 20 °C, nUV 12 h/oscuridad 12 h, (C) Conidios (en contraste de fases); barra = 15 μm , (D) Peritecio; barra = 30 μm , (E) Ascas y ascosporas; barra = 20 μm , (F,G,H) Apresorios; barra = 5 μm 58

Figura 9. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum siamense*. (A) Frente, (B) Reverso de una colonia de 7d en PDA a 28 °C, oscuridad continua, (C) Conidios (en contraste de fases); barra = 20 μm , (D) Setas; barra = 20 μm , (E, F) Apresorios; barra = 5 μm 59

Figura 10. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum theobromicola* (A) Frente, (B) Reverso de una colonia de 4d en PDA a 25 °C, luz blanca 12 h/oscuridad 12 h, (C) Conidios (en contraste de fases); barra = 20 μm , (D, E) Apresorios proliferados; barra = 5 μm . (F) Apresorio individual; barra= 5 μm 60

Figura 11. Síntomas de antracnosis en hojas inoculadas de cafeto de la variedad Caturra Rojo. (A,B,C) Hojas sin herida, (D,E,F)Hojas con herida, (A,B) Síntomas de

necrosis en ápice y bordes a los 14 ddi, (C) Síntomas a los 30 ddi. (D,E) Síntomas en heridas a las 14 ddi, (F) Síntoma de necrosis en hojas a los 30 ddi. 63

Figura 12. Reconstrucción filogenética de *Colletotrichum* de la región de **Actina** con el método de Neighbor-Joining (NJ) con modelo K2 (Kimura 2 parámetros) y 500 repeticiones de Bootstrap de 20 secuencias, 10 de este estudio (en bold) y 10 de las alineadas en mayor índice de similaridad, cobertura y score, y una secuencias de *C. kahawae* del banco de genes. Árbol construido sin raíz. *Número de aislamiento. **Numero de accesoión en GenBank. ¹En hoja con lesión atípica de *Cercospora*. ²En hoja con lesión típica de *Cercospora*.³ Fruto verde sintomático. ⁴ Fruto maduro sintomático. ⁵ Fruto momificado. 65

Figura 13. Reconstrucción filogenética de *Colletotrichum* de la región de β -tubulina con el método de Neighbor-Joining (NJ) con modelo T3 (Tamura 3 parámetros) y 500 repeticiones de Bootstrap de 20 secuencias, 10 de este estudio (en bold) y 10 de las alineadas en mayor índice de similaridad, cobertura y score, y una secuencias de *C. kahawae* del banco de genes. Árbol construido sin raíz. *Número de aislamiento. **Numero de accesoión en GenBank. 1En hoja con lesión atípica de *Cercospora*. 2En hoja con lesión típica de *Cercospora*. 3 Fruto verde sintomático. 4 Fruto maduro sintomático. 5 Fruto momificado. 66

Figura 14. Reconstrucción filogenética de *Colletotrichum* de la región de ITS con el método de Neighbor-Joining (NJ) con modelo K2 (Kimura 2 parámetros) y 500 repeticiones de Bootstrap de 20 secuencias, 10 de este estudio (en bold) y 10 de las alineadas en mayor índice de similaridad, cobertura y score, y una secuencias de *C.*

kahawae del banco de genes. Árbol construido sin raíz. *Número de aislamiento.
 **Numero de accesoión en GenBank. 1En hoja con lesión atípica de Cercospora. 2En
 hoja con lesión típica de Cercospora.3 Fruto verde sintomático. 4 Fruto maduro
 sintomático. 5Fruto momificado.. 67

Figura 15. Reconstrucción filogenética de *Colletotrichum* del concadenado de ACT, ITS y β -TUB, con el método de BIC (Bayesian Information Criterion) con modelo T3 (Tamura 3 parámetros) y 500 repeticiones de Bootstrap de las 10 secuencias de este estudio, y tres secuencias concadenadas de *C. kahawae* (números de accesoión en GenBank: JX010234, JX009638, JX010435). Bootstrap 500 réplicas. Árbol construido sin raíz. *Número de aislamiento. 1En hoja con lesión atípica de Cercospora. 2En hoja con lesión típica de Cercospora.3 Fruto verde sintomático. 4 Fruto maduro sintomático. 5Fruto momificado.. 68

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Principales estados productores de café en México en 2013 | 3 |
| Cuadro 2. Especies de <i>Colletotrichum</i> reportadas mundialmente en café..... | 8 |
| Cuadro 3. Número de aislamientos conservados y seleccionados de <i>Colletotrichum</i> por fecha de muestreo en 2013 y las características de las localidades en la zona norte del estado de Puebla de donde se obtuvieron las muestra vegetales. | 33 |
| Cuadro 4. Porcentaje de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> de tejidos sintomáticos muestreados en la zona norte de Puebla durante en 2013 | 38 |
| Cuadro 5. Especies de <i>Colletotrichum</i> identificadas en el cultivo de café variedad Caturra Rojo en zona norte de Puebla..... | 61 |

CAPITULO I. MARCO DE REFERENCIA

1. Introducción general

El grano del cultivo de cafeto es usado para preparar bebidas y es un producto de exportación importante en muchos países de África, América Latina y Asia. Además de que proporciona un medio de vida para más de 120 millones de personas en todo el mundo (Osorio, 2002). La especie *Coffea arabica* L., aporta aproximadamente el 63% de la producción mundial total de grano de café, el resto de la producción es por *C. canephora* Pierre ex Froehner (sin. *C. robusta*) (Gichuru *et al.*, 2008).

En México, el cultivo y consumo del café como bebida data del siglo XVIII; a más de doscientos años de su introducción, el grano es considerado uno de los cultivos de mayor importancia económica, sociocultural y ambiental (Pérez-Pérez y Díaz-Cárdenas, 2000). En la actualidad, el cafeto es el séptimo cultivo agrícola con mayor superficie cultivada en México, 737,577.83 ha en 2013 (SIAP, 2014). Los principales estados productores son: Chiapas, Veracruz, y Puebla, tercer productor nacional, y el cual obtuvo una producción de 136,864.84 t en el 2013 (SIAP, 2014a).

Entre las enfermedades fungosas del cultivo del cafeto se encuentra la antracnosis en hojas, tallos y frutos, por especies de *Colletotrichum*. Este patógeno también afecta a otras especies de plantas, incluyendo varios cultivos de importancia económica (Cai *et al.*, 2009).

La identificación precisa de las especies patógenas es fundamental para entender la epidemiología y para desarrollar un control eficaz de las enfermedades. La identificación de las especies de *Colletotrichum* basada en la morfología ha sido

limitada porque hay pocos caracteres morfológicos y muchos de éstos dependen de los medios de cultivo agar y de las condiciones de incubación (Cai *et al.*, 2009).

Actualmente la identificación de especies de *Colletotrichum* es por análisis multilocus, y conjuntamente con estudios morfológicos, son utilizados para efectuar una correcta identificación. Debido a ello se han descubierto nuevas especies de *Colletotrichum*, y se han reclasificado especies que se habían identificado solo en base a morfología.

Con la hipótesis de que en México al presente no se ha efectuado un “efectivo y valido” diagnóstico de las especies de *Colletotrichum* en el cultivo de cafeto”, se plantearon los siguientes objetivos.

2. Objetivos generales

- ⊙ Caracterizar las especies de *Colletotrichum* por técnicas morfológicas y de análisis multilocus para conocer la diversidad de especies del patógeno en el cultivo del cafeto en la zona norte del estado de Puebla.

- ⊙ Describir los síntomas de antracnosis del cafeto en hojas, ramas y frutos.

3. Revisión de literatura

3.1 Importancia del cultivo del café

El café se originó en Etiopía en el siglo XII y llegó a México a finales del siglo XVIII. El café se expandió y desarrolló durante el siglo XIX como cultivo de plantación (Zamarripa-Colmenaro y Escamilla-Prado, 2002).

La cafecultura es una actividad de gran importancia económica, social, cultural y ambiental en México. Entre los beneficios más relevantes del café están la generación de divisas y empleos, el desarrollo de diversas zonas productoras distribuidas en la región centro sur de México, y los servicios ambientales asociados al cultivo que es bajo sombra (Zamarripa-Colmenaro y Escamilla-Prado, 2002). Aunque el café se cultiva en quince estados de México, el 91.4% de la producción nacional se obtiene solo de cuatro entidades: Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca (Cuadro 1) (SIAP, 2014a).

Cuadro 1. Principales estados productores de café en México en 2013*

| Estado | Producción (t) | **Sup.Sembrada (ha) | Sup. Cosechada (ha) |
|----------|-------------------|------------------------|------------------------|
| Chiapas | 499,105.16 | 259,315.74 | 253,752.79 |
| Veracruz | 365,333.44 | 147,384.41 | 139,268.81 |
| Puebla | 136,864.84 | 72,174.85 | 54,205.85 |
| Oaxaca | 129,756.01 | 142,766.07 | 138,236.08 |

*SIAP 2014 a **Superficie

De los 217 municipios que conforman el estado de Puebla en 54 de ellos se siembra café siendo los de mayor importancia por orden de producción: Xicotepec, Zihuateutla, Hueytamalco y Jalpan, ubicados en la región norte del estado (SIAP, 2014a).

3.2 Clasificación

El café pertenece a la familia Rubiaceae y al género *Coffea*, que comprende más de 40 especies. De éstas, 19 tienen importancia económica pero solo cuatro especies se cultivan comercialmente: café arábigo o *Coffea arabica*, café robusta o *C. canephora*, café excelso o *C. exelsa* y café liberiano o *C. liberica* (Charrier y Berthaud, 1985). En México, y a nivel internacional *C. arabica* y *C. canephora* son las de mayor importancia. *Coffea arabica* la de mayor importancia en extensión cultivada aporta el 99% de la producción y *C. canephora*, se produce principalmente en regiones de clima cálido como Chiapas, Oaxaca y Veracruz (Escamilla, 1993).

En México la producción de café arábigo se obtiene de las variedades comerciales: Bourbon, Catuaí, Caturra Rojo, Garnica, Maragogipe, Mundo Novo, Pluma Hidalgo y Típica (Zamarripa-Colmenaro y Escamilla-Prado, 2002).

3.3 Descripción botánica

C. arabica es un árbol pequeño, que crece hasta aproximadamente 15 m de altura, aunque comercialmente su altura está limitada por la poda. Las hojas son perenes, glabras y brillantes con venas bien marcadas; en cada nodo se forman dos hojas en lados opuestos de los tallos. Las hojas maduras son opuestas y son de color verde oscuro, de forma elípticas con una punta acuminada (Willson, 1999). Tiene un

tallo principal y de él salen ramas primarias y estas a su vez producen ramas secundarias en las que se producen las flores. La planta forma una raíz pivotante corta, raramente, de más de 45 cm y las raíces laterales se ramifican horizontalmente desde la raíz principal de cuatro a ocho metros y tienden a crecer hacia abajo hasta un máximo de tres metros (Willson, 1999).

Pequeñas flores blancas fragantes se forman en racimos en las axilas de las hojas (Willson, 1999). El fruto del cafeto denominado cereza, botánicamente es una drupa bicarpelar de forma subglobosa u ovoide, de 8 a 15 mm de diámetro y de 10 a 18 mm de largo (Escamilla, 1993).

Las partes del fruto son el epicarpio, cubierta o película externa conocida comúnmente como piel, cáscara o pellejo; el mesocarpio, tejido carnoso, mucilaginoso ubicado entre el epicarpio y endocarpio, se caracteriza por su riqueza en sustancias pépticas y azúcares, es conocido como mucilago; el perispermo, película plateada que corresponde a la cubierta o tegumento seminal (membrana) que cubre la cavidad interna del ovario; el endocarpio que es una capa coriácea de tejido lignificado que recubre y protege al endospermo y es conocido como pergamino; y el endospermo, que es el grano desprovisto de todas sus cubiertas, y el cual está formado por el cotiledón y el embrión. El fruto posee una semilla dicotiledónea de forma plano convexa de tamaño variable (Escamilla, 1993).

3.4 Enfermedades del cafeto

El cafeto tiene la ventaja relativa de que, con los doscientos años de cultivo en México (al menos la variedad Típica o Criollo), es una planta adaptada a las

condiciones agroclimáticas de las regiones cafetaleras. Sin embargo por los altos precios en el mercado, la superficie cultivada se ha extendido hacia zonas marginales con temperatura, suelos y/o precipitación desfavorables. Por lo que las plantaciones están sometidas a mayor stress y más predispuestas al ataque de plagas y enfermedades (Santoyo-Cortés *et al.*, 1995).

En México se reportan 16 plagas de importancia económica y 17 enfermedades atacando al cultivo del cafeto. Entre las de mayor relevancia en el país, de acuerdo a Santoyo-Cortés *et al.*(1995) se encuentran: la roya del cafeto por *Hemileia vastatrix*, koleroga o mal de hilachas por *Corticium koleroga*, ojo de gallo por *Mycena citricolor*, mancha de hierro por *Cercospora coffeicola*, mal del talluelo o Damping off por *Rhizoctonia solani* y otros; y antracnosis por *Colletotrichum coffeanum* (CNC, 1955).

Actualmente la especie *C. coffeanum* fue su Sistemática reanalizada y se considera paso a ser un sinónimo de *C. gloeosporioides* (Waller *et al.*, 1993). Además, en Sistemática se desconoce a la especie *C. coffeanum* var. *virulans* por no cubrir los señalamientos que marca el Código de Nomenclatura de Hongos (Waller *et al.*, 1993).

Las enfermedades del cafeto constituyen un factor adverso, que reduce la producción, y su intensidad está en función de las condiciones ecológicas en que se ubican las plantaciones. Generalmente los síntomas se manifiestan cuando se presentan condiciones de temperatura y humedad adecuadas para su desarrollo y se intensifican cuando el suelo presenta deficiencias nutrimentales, la fertilización es insuficiente o las prácticas culturales son inadecuadas (Escamilla, 1993).

3.5 La antracnosis del cafeto

En el mundo se han reportado 16 especies de *Colletotrichum* en cafeto, las cuales han sido aisladas de frutos, ramas y hojas (Cuadro 2).

Colletotrichum fue descrito en 1831 por Corda, quien proporcionó dibujos de *C. lineola* en tallo de un huésped no identificado perteneciente a la familia Apiaceae y colectados a finales del otoño, cerca de Praga, República Checa (Damm *et al.*, 2009).

Varias especies de *Colletotrichum* pueden causar enfermedades en cafeto (Freeman, 2000). Por ejemplo: *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* pueden causar enfermedad en los frutos maduros (Masaba y Waller, 1992).

En Africa, los daños por *C. kahawae* J.M Waller & P.D. Bridge, agente causal del fruto del café (EFC) son de gran impacto en la producción con pérdidas de rendimiento de hasta el 80% (Varzea *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005).

En México *C. kahawae* se encuentra cuarentenado por la norma oficial Mexicana NOM-019-FITO-1995, por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de *C. kahawae*. La EFC no ha sido reportado fuera de África, aunque algunas enfermedades menos graves, como el tizón café rojizo de la maduración de los frutos causado por otras especies de *Colletotrichum* se producen en todo el mundo; y en varias condiciones también la muerte descendente de ramitas en Costa Rica, Guatemala y la India se han asociado con *C. gloeosporioides* (Hindorf y Muthappa, 1974; Gielink and Vermeulen, 1983).

Cuadro 2. Especies de *Colletotrichum* reportadas mundialmente en cafeto.

| Especie | Tejido | País | Lugar de colecta | Especie de cafeto | Referencia |
|------------------------------|---------------------|------------------|---|-------------------------------------|---|
| 1. <i>C. acutatum</i> | Frutos | Vietnam | <u>Norte:</u> Ha Tay, Nghe An, Son La y Yen Bai | <i>Coffea</i> spp.* | Nguyen <i>et al.</i> , 2010 |
| 2. <i>C. boninense</i> | Ramas Hojas | | <u>Sur:</u> Dak Lac y Lam Dong, | | “ |
| 3. <i>C. capsici</i> | Frutos Ramas | Vietnam | .- | | “ |
| 4. <i>C. gloeosporioides</i> | Frutos Hojas | Vietnam | .- | | “ |
| 5. <i>C. karstii</i> | Frutos | Vietnam | .- | <i>C. sp.</i> * | Damm <i>et al.</i> , 2012b |
| 6. <i>C. walleri</i> | Hoja | Vietnam | Buon Ma Thuot-Dak Lac | <i>C. sp.</i> * | Damm <i>et al.</i> , 2012a |
| 7. <i>C. asianum</i> | Frutos | Tailandia | Chiang Mai | <i>C. arabica</i> * | Prihastuti <i>et al.</i> , 2009 |
| 8. <i>C. fructicola</i> | Frutos | | | | |
| 9. <i>C. siamense</i> | Frutos | | | | |
| 10. <i>C. costarricense</i> | Frutos Ramas | Costa Rica | Turrialba | <i>C. arabica</i> cv. Típica | Damm <i>et al.</i> , 2012a |
| 11. <i>C. cuscatae</i> | Ramas | Angola | | <i>C. arabica</i> * | Damm <i>et al.</i> , 2012a |
| 12. <i>C. fragariae</i> | s, i ^{***} | Angola Brazil | Amboim | <i>C. sp.</i> * <i>C. sp.</i> ** | Silva <i>et al.</i> , 2012 |
| 13. <i>C. gigasporum</i> | s, i ^{***} | Colombia | Madeira | <i>C. arabica</i> var. Típica | Rakotoniriana <i>et al.</i> , 2012 |
| 14. <i>C. kahawae</i> | Fruto | Kenia Malawi | | <i>C. arabica</i> * | Waller <i>et al.</i> , 1993 |
| 15. <i>C. queenslandicum</i> | Fruto | Fiji | | <i>C. sp.</i> * | Weir <i>et al.</i> , 2012 |
| 16. <i>C. theobromicola</i> | Hoja Flor | Australia | Isla Melville | <i>C. arabica</i> * | James <i>et al.</i> , 2014 [¶] |

* No incluye la variedad Caturra Rojo. ** Si incluye variedad Caturra Rojo. *** Sin información

Las formas de infección entre las especies pueden ser diferentes, por ejemplo: *C. kahawe*, ataca flores, frutos maduros y ocasionalmente hojas. Las pérdidas de mayor importancia son la que se producen después de la infección de frutos verdes, los cuales pueden caer prematuramente o permanecer en una condición momificada unidos al árbol. En tanto que *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* atacan frutos (cerezas) rojos, sin embargo son incapaces de infectar frutos verdes (Waller *et al.*, 1993).

3.5.1 Sintomatología

Las especies de *Colletotrichum* causan antracnosis, la cual es una enfermedad del follaje, tallos y frutos del cafeto. Típicamente la antracnosis aparece como manchas grandes o pequeñas de colores oscuros, o lesiones necróticas ligeramente hundidas. Además de las manchas foliares, la antracnosis con frecuencia tiene una etapa inicial prolongada en la infección de los frutos y puede producir la muerte descendente de las ramitas o ramas de las plantas (Bailey *et al.*, 1992; Agrios, 2005).

Los tejidos de las plantas pueden ser colonizados intracelularmente por *Colletotrichum*. Cuando esto pasa el patógeno crece necrotróficamente; ésta fase, es la responsable de la antracnosis y síntomas de necrosis típicos de las enfermedades causada por especies de *Colletotrichum*. Durante esta etapa el patógeno tiene un crecimiento en todos los tejidos del huésped, dentro de las células, en las paredes y en el espacio intercelular (Bailey *et al.*, 1992).

3.5.1.1 Hojas

En hojas se pueden observar áreas necróticas irregulares, de tamaño variable pudiendo alcanzar hasta 3 cm de diámetro, ubicadas en el borde de la hoja o bien al

centro, algunas veces con bordes amarillentos y que en etapas avanzada pueden aumentar de tamaño y coalescer invadiendo gran parte de la hoja y provocando su caída. En ocasiones estas manchas se observan de color blanco ceniciento y donde se forman los acérvulos (Ferreira *et al.*, 2009a) (Figura 1).

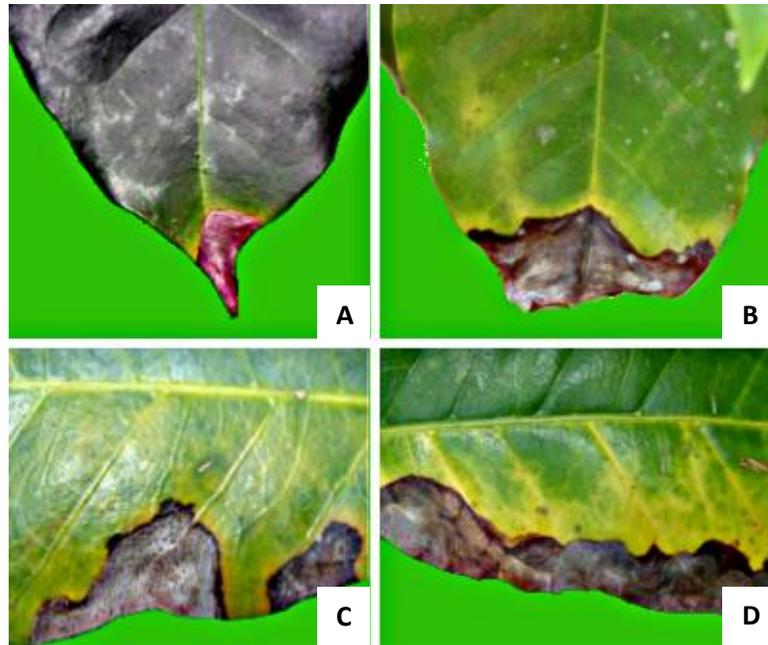


Figura 1. Síntomas de antracnosis reportados por FUNICA (s/a) (página web) en hojas de cafeto. **(A)** En ápices de hojas, **(B - D)** En bordes de hojas.

3.5.1.2 Relación de *Colletotrichum* con *Cercospora* en hojas

La mancha de hierro u ojo de gallo ocasionada por *Cercospora* es una de las enfermedades más antiguas reportadas en cafeto (Coelho *et al.*, 2011). El síntoma clásico por *Cercospora* en hojas son manchas circulares de 1.0 a 1.5 cm de diámetro, de color café, con centro gris o blanco y algunas veces rodeadas por un halo brillante amarillento (Nelson, 2008). Topete (1966) reporta que *Colletotrichum* generalmente está asociado con *Cercospora*, pero cuando atacan por separado, las lesiones por

Colletotrichum son sin zonas concéntricas, y las de *Cercospora* son con zonas concéntricas (Figura 2).



Figura 2. Síntoma típico de *Cercospora* en hojas de cafeto caracterizado por Nelson (2008), lesiones con zonas concéntricas y con halo amarillo.

Así en ocasiones *Colletotrichum* es considerado como un hongo oportunista dado que aprovecha el daño causado por otros organismos como *Cercospora* para penetrar en el tejido de la planta (Nelson, 2008).

3.5.1.3 Ramas

En ramas regularmente la enfermedad comienza por las puntas, este síntoma es conocido como muerte descendente y consiste en un necrosamiento del tallo que inicia en el ápice, avanzando hacia abajo causando pudrición y momificación de los frutos que están adheridos, y conforme la enfermedad avanza sobre la rama la pudrición del tallo toma una coloración oscura a gris (Ferreira *et al.*, 2009a). La enfermedad

también puede comenzar desde cualquier otro punto de la rama en forma de manchas color café y extenderse a lo largo. Esta enfermedad provoca un gran número de ramas muertas que causan deterioro de la planta, y en consecuencia baja la producción de flores y frutos.

3.5.1.4 Frutos

En frutos verdes o rojos las lesiones comienzan como pequeñas manchas de color café hundidas e irregulares de 2 a 4 mm de diámetro. Posteriormente se vuelven de color oscuro de forma circular o irregular, hasta que finalmente los frutos terminan completamente secos y acaban por desprenderse de la planta y los pocos que quedan adheridos a la planta terminan momificados (Ferreira *et al.*, 2009a).

3.5.2 Proceso de infección

En presencia de humedad los conidios de *Colletotrichum* germinan y producen un tubo germinativo sobre la superficie del hospedante; estos se diferencian en sus extremos formando un apresorio melanizado oscuro, a partir del cual penetran directamente la cutícula por acción de enzimas o fuerza mecánica. Dentro del tejido se forma inicialmente un haustorio a partir del cual se desarrollan hifas que colonizan el tejido, intra e intercelularmente, sin ocasionar síntomas externos visibles; finalmente el tejido muere y sobre él se inicia la producción de conidios. En esta fase necrotrófica el hongo provoca una intensa degradación de las paredes celulares del hospedante (Gil, 1992; Loubet *et al.*, 1997).

En hipocotilos y hojas de cafeto los conidios de *C. gloeosporioides* germinan de 6 a 8 h después de la inoculación, los apresorios se producen 12 h después de la

inoculación, y la mayoría de ellos penetra directamente a través de la cutícula (Ferreira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009). En comparación los conidios de *C. kahawae* (cuarentenado) germinan sobre los frutos de cafeto y forma un apresorio entre 4 a 6 h después de la inoculación, penetra la epidermis entre las 8 a 16 h siguientes y continúa con la colonización de los tejidos, la cual conduce a la degradación de las paredes de las células subepidermales. Los primeros acérvulos, estructuras de reproducción asexual, subcuticular o subepidermal donde se forman los conidios en conidióforos cortos sobre tejido hundido, aparecen aproximadamente a los siete días y a los 14 días la producción en masa de conidios (Loubet *et al.*, 1997).

3.5.3 Epidemiología

Las enfermedades causadas por *Colletotrichum* están limitadas tanto por la resistencia del tejido de la planta como por requerimientos ambientales para que la infección exitosa tenga lugar (Waller, 1992).

Las mayores fuentes de inoculo son los conidios en acérvulos y las ascosporas liberadas por peritecios. Los peritecios son estructuras piriformes, producidas por la fase sexual o teleomorfa (*Glomerella*) del género *Colletotrichum*, caracterizadas por un ostiolo por donde liberan las ascosporas a partir de ascas. Las ascosporas y conidios cuando jóvenes, se acumulan en masas mucilaginosas (mezcla compleja principalmente de polisacáridos y glucoproteínas con varios componentes menores que incluyen varias enzimas) (Bailey *et al.*, 1992).

Por lo común, el hongo inverna en tallos, hojas y frutos enfermos de las plantas en forma de micelio o esporas. Cuando se forman las ascosporas en frutos momificados, se producen infecciones primarias en la primavera, pero casi siempre

éstas no son necesarias. El micelio superviviente rápidamente produce conidios en la primavera, los cuales producen infecciones primarias y subsecuentes infecciones secundarias continuas durante toda la estación de crecimiento en tanto que la temperatura y la humedad sean favorables (Agrios, 2005).

Los conidios producidos en acérvulos se dispersan por el salpique de la lluvia, lo cual indica que hay separación y transporte del patógeno por el impacto de gotas, siendo estos dos aspectos esenciales para procesos físicos en el ciclo de la enfermedad. La lluvia y la intensidad de ella juegan un papel importante en la dispersión de esporas (Bailey *et al.*, 1992). Para la dispersión a grandes distancias, el hombre, los pájaros, los insectos, el material de empaque, los vehículos y las plántulas o el material vegetativo de cafeto juegan un papel importante en la diseminación de la enfermedad (Flood *et al.*, 2001).

La temperatura óptima para la germinación de conidios en frutos de café de *C. acutatum* se encuentra entre los 21 y 29 °C y para *C. gloeosporioides* entre 25 y 31 °C (Kenny *et al.*, 2012).

3.5.4 Control

Dentro de los métodos más comunes de control de la antracnosis en cafeto se encuentran disminuir la sombra en las plantaciones y realizar poda oportuna de cafetos y control de malezas (Escamilla, 1993). La ubicación de las fuentes de inóculo y su rápido desarrollo bajo condiciones adecuadas, reduce la eficacia de muchas prácticas culturales, sin embargo la higiene de la plantación ocupa un lugar en el control integral de la enfermedad (Waller, 1992). Debido a que una buena aireación del cultivo, secado rápido del follaje y disminución del inóculo en la planta, lo cual se obtiene con

distancias de siembra amplias, manejo oportuno de arvenses y una adecuada eliminación de fuentes de inóculo, disminuyen el impacto de la enfermedad (Flood *et al.*, 2001).

El control químico se ha utilizado en el control de la EFC y se realiza con la aplicación de fungicidas cúpricos y orgánicos, en tanto que fungicidas sistémicos del grupo de los triazoles son igualmente efectivos para el control de la enfermedad (Firman and Waller, 1977).

Métodos de control biológico para enfermedades causadas por *Colletotrichum* están recibiendo cada vez mayor atención. Sin embargo aún faltan otros estudios para lograr métodos prácticos que puedan ser utilizados en campo. Dada la versatilidad epidemiológica de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* en cultivos perennes, el control biológico deberá ser integrado con otras técnicas de control para tener un mayor efecto (Waller, 1992).

3.6 Importancia de *Colletotrichum*

Los hongos filamentosos como *Colletotrichum* son patógenos destructivos que causan pérdidas económicas por enfermedades en cultivos en todo el mundo (Hyde *et al.*, 2009). *Colletotrichum* causa antracnosis, y afecta a una amplia gama de hospedantes, sobre todo en cultivos anuales de zonas tropicales y subtropicales, así como árboles frutales (Sutton, 1992).

En Africa *Colletotrichum kahawae*, agente causal de la enfermedad del fruto del café (EFC) provoca entre 70 y 80% de pérdidas en el cultivo del cafeto lo cual asciende a entre 300 y 500 millones de dólares (Zhenjia *et al.*, 2004). En la India en mango *Colletotrichum* ocasiona hasta 39% de pérdidas (Prakash, 2004), y en Francia se

reporta que *Colletotrichum acutatum* causa hasta 80% de pérdidas en el cultivo de fresa (Denoyes y Baudry, 1991).

Basado en análisis científico y la importancia económica, *Colletotrichum* fue propuesto recientemente como el octavo grupo más importante de hongos patógenos de plantas en el mundo (Dean *et al.*, 2012).

3.7 Clasificación taxonómica

Dominio: Eukariota

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Sub filo: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

(NCBI, 2015)

3.8 Nomenclatura

La identificación de especies de *Colletotrichum* se complica ya que las especies tienen pocos caracteres morfológicos que se puedan distinguir y porque la fase teleomórfica rara vez se forma (Hyde *et al.*, 2009).

Tradicionalmente las especies de *Colletotrichum* han sido identificadas y delimitadas en base a caracteres morfológicos; en cultivo agar, varias características han sido utilizadas por los taxónomos incluyendo el tamaño y forma de conidios, conidióforos y apresorios; presencia o ausencia de setas, esclerocios, esporodoquios, y el estado teleomorfo; y características culturales por frente y reverso de la colonia como color, tasa de crecimiento, organización del micelio y distribución de estructuras morfológicas (Simmonds, 1965; Sutton, 1992; Than *et al.*, 2008; Thaug, 2008).

Los criterios anteriores por sí solos no son siempre adecuados para la diferenciación fiable entre especies de *Colletotrichum* por la variación en la morfología del fenotipo entre especies que se expresa según las condiciones ambientales de incubación (Hyde *et al.*, 2009a). Adicionalmente, la diferenciación entre las especies de *Colletotrichum* basadas en el rango de hospedantes puede ser poco fiable, ya que taxones como *C. acutatum*, *C. dematium*, *C. gloeosporioides*, y *C. graminicola* infectan una amplia gama de plantas huésped (Sutton, 1992).

La taxonomía y nomenclatura del género *Colletotrichum* es confusa, incluso para los científicos que trabajan en Sistemática, por lo que el diagnóstico incorrecto de especies no es raro (Hyde *et al.*, 2009b).

Enfoques moleculares han sido utilizados con éxito en la identificación de especies de *Colletotrichum* además de estudios morfológicos (Sreenivasaprasad *et al.*, 1993; Vinnere *et al.*, 2002).

Análisis filogenéticos de un gen no han demostrado ser muy exitosos en la delineación de las especies (Hyde *et al.*, 2009a), por lo que actualmente se han propuesto análisis moleculares filogenéticos utilizando multilocus con el uso de seis a más genes como: espacios internos de transcripción o (ITS), beta tubulina, calmodulina, quitina sintetasa, glicelaldehído-3-fosfato deshidrogenasa e histona (Damm *et al.*, 2012ab; Weir *et al.*, 2012) los cuales están proporcionando mayor evidencia y objetividad para determinar los límites de especies, particularmente por el uso de la concordancia genealógica en el reconocimiento de las especies filogenéticas (Taylor *et al.*, 2000).

En la actualidad el uso combinado de herramientas como el diagnóstico molecular junto con técnicas de morfología tradicionales es un adecuado y buen enfoque para el estudio de complejos de especies de *Colletotrichum* (Cannon *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2009).

Por todo lo anterior es fundamental identificar con precisión las especies de *Colletotrichum* debido a la importancia del cultivo del café en México, así como la presencia o conocimiento de una especie de importancia cuarentenaria que es *C. kahawae*, la que puede afectar la bioseguridad y poner en riesgo la producción de café en nuestro país de no mantenerse una alerta fitosanitaria a través de un constante diagnóstico en las plantaciones de café.

4. Referencias

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5^a ed. Elsevier Academic Press. San Diego, California. USA 948 p.
- Bailey, J.A., R.J. O'Connell, R. Pring, and C. Nasch. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A., and M.J. Jeger (eds.). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. CAB International. Wallingford U. K . pp: 88-120.
- Cai, L., K.D. Hyde, P.W.J. Taylor, B.S. Weir, J. Waller, M.M. Abang, J.Z. Zhang, Y.L. Yang, S. Phoulivong, Z.Y. Liu, H. Prihastuti, R.G. Shivas, E.H.C. McKenzie, and P.R. Johnston. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39:183-204.
- Cannon, P.F., P.D. Bridge, and E. Monte. 2000. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: Prusky, D., S. Freeman D.S., and M.B. Dickman (eds.). *Colletotrichum Host Specificity, Pathology and Host-pathogen Interaction*. APS Press, St Paul, Minnesota U.S.A pp: 1-20.
- Charrier, A., and J. Berthaud. 1985. Botanical Classification of Coffee. In: Clifford M.N., and K.C. Willson (eds.). *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. Sídney, Australia. pp: 13-47.
- Chen, Z.J., J. Liang, and C.J. Rodrigues. 2005. *Colletotrichum gloeosporioides* can overgrow *Colletotrichum kahawae* on green coffee berries first inoculated with *C. kahawae*. *Biotechnology Letters* 27:679-682.
- Coelho, A.G.S., F.R. Ávila, L.A. Maffia, and E.S.M. Gomide. 2011. Infection Process of *Cercospora coffeicola* on Coffee Leaf. *J Phytopathol* 159:6-11.
- CNC. 1952. Manual práctico del cultivo de cafeto en México. México 216 p.

- Damm, U., J.H.C. Woudenberg, P.F. Cannon, and P.W. Crous. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39:45-87.
- Damm, U., P.F. Cannon, J.H.C. Woudenberg, and P.W. Crous. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73:37-113.
- Damm, U., P.F. Cannon, J.H.C. Woudenberg, P.R. Johnston, and B. Weir. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*. 73:1-36.
- Dean, R., J.A.L. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, and A. Di Pietro. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:414-430.
- Denoyes, B., and A. Baudry. 1991. Characterization of species of *Colletotrichum* isolated from strawberry in France: taxonomy and pathogenicity (abstract). *In: Strawberry Diseases and Breeding for Varietal Resistance International Workshop, Bordeaux.*
- Escamilla, P.E. 1993. El café cereza en México: tecnología de la producción. Universidad Autónoma Chapingo. México 116 p.
- Ferreira, J.B., M. de Abreu, E. Alves, I.S. Pereira and K.D. Fernandes. 2009. Events of the infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves of *Coffea arabica* L. *Summa Phytopathologica* 35:273-281.
- Ferreira, J.B., M.S. Abreu, I.S.A. Pereira, K.D. Fernandes, and R.B. Pereira. 2009a. Efeito de fungicidas e influência de fatores climáticos sobre a mancha manteigosa no cafeeiro. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 33(2):417-424.

- Firman, I.D., and J.M. Waller. 1997. Coffee berry disease and other *Colletotrichum* diseases of coffee. Kew, Surrey, Commonwealth Mycological Institute. Phytopathological Papers No. 20. 53 p.
- Flood, J., V.L.F. Gil, and J.M. Waller. 2001. Coffee diseases: a clear and present danger. *In*: Baker P.S. (ed.) Coffee futures; a source book of some critical issues confronting the coffee industry. The Commodities Press. Chinchiná, Colombia. pp: 82-93.
- Freeman, S. 2000. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. *In*: Prusky, D., S. Freeman, and M.B. Dickman (eds.). *Colletotrichum* Host Specificity, Pathology and Host-pathogen Interaction. APS Press, St Paul, Minnesota U.S.A pp: 131-144.
- FUNICA, s/a. Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua. Guía de identificación y manejo de antracnosis en café. Disponible en <http://www.funica.org.ni/index/biblioteca/resultados-deinvestigacion/category/87-Cafe.html?download=445:Gua%20Antracnosis>.
- Gichuru, E.K., C.O. Agwanda, M.C. Combes, E.W. Mutitu, E.C.K. Ngugi, B. Bertrand, and P. Lashermes. 2008. Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathology* 57:1117-1124.
- Gielink, A.J., and H. Vermeulen. 1983. The ability of American and African *Colletotrichum* isolates in cause coffee berry disease symptoms and association of some isolates with *Glomerella cingulata*. *The Netherland Journal of Plant Pathology* 89:188-190.

- Gil, V.L.F. 1992. Morphological and cellular characterisation of *Colletotrichum* isolates from *V. radiata*, *V. unguiculata* y *P. vulgaris*. Bristol, University of Bristol. Tesis de maestria 42 p.
- Hindorf, H., and B.N Muthappa, 1974. A comparison of *Colletotrichum coffeanum* Noack from South India and Kenya. *Phytopathologische Zeitschrift*. Journal of Phytopathology 80:9-12.
- Hyde, K.D., L. Cai, E.H.C. McKenzie, Y.L. Yang, J.Z. Zhang, and H. Prihastuti. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39:1-17.
- Hyde, K.D., L. Cai, P.F. Cannon, J.A. Crouch, P.W. Crous, U. Damm., P.H. Goodwin, H. Chen, P.R. Johnston, E.B.G Jones, Z.Y Liu, E.H.C McKenzie, J. Moriwaki, P. Noireung, S.R. Pennycook, L.H. Pfenning, H. Prihastuti, T. Sato, R.G. Shivas, Y.P. Tan, P.W.J. Taylor, B.S. Weir, Y.L. Yang, and J.Z. Zhang. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity* 39:147-183
- James. R.S, J. Ray, Y. P. Tan, and R. G. Shivas. 2014. *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Disease. Nota* 9:138.
- Kenny, M.K., V.J. Galea, and T.V. Price. 2012. Germination and growth of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee in Papua New Guinea and their pathogenicity to coffee berries. *Australasian Plant Pathology*. 41:519-528.
- Loubet, S., D. Bieysse, F.N. Michaux, and D. Berry. 1997. L'antracnose des baies (CBD) du caféier arabica: aspects microscopiques des interactions hôte-parasite.

- In*: Colloque scientifique international sur le café, 20-25 Juillet, Nairobi, Paris. pp. 718-722.
- Masaba, D.M., and J.M. Waller. 1992. Coffee berry disease: The current status. In: Bailey, J.A., and M.J. Jeger (eds.). *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. CAB International. Wallingford U. K . pp: 237-249.
- NCBI. 2015. National Center for Biotechnology Information. Taxonomia de *Colletotrichum*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5455>. Fecha de consulta: 18 de abril de 2015.
- Nelson, S.C. 2008. *Cercospora* leaf spot and berry blotch of coffee. Department of Plant and Environmental Protection Sciences Plant Disease. College of Tropical Agriculture and Human Resource. Disponible en: <http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-41.pdf>
- Nguyen, P.T.H., O.V. Pettersson, P. Olsson, and E. Liljeroth. 2010. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. *European Journal of Plant Pathology* 127:73-87.
- Osorio, N. 2002. *The Global Coffee Crisis: A Threat to Sustainable Development*. London, UK: International Coffee Organisation. pp 4.
- Pereira, I.S., M.S. de Abreu, E. Alves, and J.B. Ferreira. 2009. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – cafeeiro. *Bragantia* 68:117-123.
- Pérez-Pérez, J.R., y S. Díaz-Cardenas. 2000. *El café, bebida que conquistó al mundo*. México, Universidad Autónoma de Chapingo. México. 151 p.

- Prakash, O. 2004. Diseases and disorders of mango and their management. *In* S. A. M. H. Naqvi (ed.), Diseases of fruits and vegetables: Diagnosis and management. Dordrecht: Kluwer. pp. 511–619
- Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E.H.C. McKenzie, and K.D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39:89-109.
- Rakotoniriana, E.F., J. Scauflaire, C. Rabemanantsoa, S. Urveg-Ratsimamanga, A.M. Corbisier, J. Quetin-Leclercq, S. Declerck, and F. Munaut. 2013. *Colletotrichum gigasporum* sp. nov., a new species of *Colletotrichum* producing long straight conidia. *Mycological Progress* 12:403-412.
- Santoyo-Cortés, V.H., S. Díaz-Cárdenas, y B. Rodríguez-Padrón. 1995. Sistema agroindustrial café en México. Diagnóstico, problemática y alternativas. México, Universidad Autónoma de Chapingo - CIESTAAM. México. 157 p.
- SIAP. 2014. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). Cierre de la producción agrícola por estado. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado>. Consultado el 18 de abril del 2015.
- SIAP. 2014a. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). Cierre de la producción agrícola por cultivo. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> Consultado el 18 de abril del 2015.
- SIAP. 2014b. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). Panorama del café. Financiera Nacional de desarrollo. Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero Disponible en: <http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Panoramas/Panorama%20Caf%C3%A9%20%28may%202014%29.pdf>.

Consultado el 18 de abril del 2015.

- Silva, D.N., V. Várzea, L. Cai, P.O. Siqueira, and D. Batista. 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.
- Simmonds, J.H. 1965. A study of species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agriculture and Animal Science* 22: 437-459.
- Sreenivasaprasad, S., A.E. Brown, and P.R. Mills. 1993. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycological Research*, 97:995-1000.
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J.A., and M.J. Jeger (eds.). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. CAB International. Wallingford U.K . pp: 1-26.
- Taylor, J., D. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D. Geiser, D. Hibbett, and M. Fisher. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31:21-32.
- Than, P.P., H. Prihastuti, S. Phoulivong, P.W.J Taylor, and K.D. Hyde. 2008. Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University: Science B* 9:764-778.
- Thaug, M.M. 2008. Coelomycete systematics with special reference to *Colletotrichum*. *Mycoscience* 49:345-350.

- Topete, P.E. 1996. Manual de plagas y enfermedades del cafeto. Instituto Mexicano del Café. México, 70 p.
- Varzea, V.M., C.J. Rodrigues, and B.G. Lewis. 2002. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawe* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathology* 51:202-207.
- Vinnere, O., J Fatehi, S.A.I. Wright, and B. Gerhardson. 2002. The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. *Mycological Research* 106:60–69.
- Waller J.M. 1992. Diseases of Perennial and other Cash Crops. *In* J. A. Bailey and M.J. Jeger (eds.), *Colletotrichum: Biology, pathology and control* Wallingford: CAB International pp. 88-120.
- Waller, J.M., P.D. Bridge, B. Black, and G. Hakiza. 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycological Research* 97:989-994.
- Weir, B., P.R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73:115-180.
- Willson, K.C. 1999. Coffee, cocoa and tea. CABI Publishing Oxon. 300 p.
- Zamarripa-Colmenaro, A., y E. Escamilla-Prado. 2002. Variedades de café en México. Origen, características y perspectivas, Huatusco. Universidad Autónoma Chapingo. México. 39 p.
- Zhenjia, C., M.A. Nunes, and M.C. Silva. 2004. Centro appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration. *Mycologia*, 96(6):1199–1208.

CAPITULO II. SINTOMATOLOGÍA RELACIONADA CON ANTRACNOSIS Y SU ASOCIACIÓN CON *Colletotrichum* EN PLANTACIONES DE CAFETO EN PUEBLA

Resumen

De junio a noviembre del 2013 se efectuaron muestreos en tres municipios productores de cafeto de la zona norte del estado de Puebla y donde se colectaron hojas, tallos y frutos de la Variedad Caturra Rojo con necrosis o manchas. Los síntomas encontrados fueron descritos y fotografiados. Tejidos sintomáticos desinfestados se sembraron en MEA al 2% e incubaron en luz constante cercana a la UV a temperatura ambiente. Las colonias aisladas se purificaron por cultivo monospórico. Se aisló *Colletotrichum* de síntomas de hojas con necrosis y se encontró la presencia de *Cercospora* en asociación con *Colletotrichum* en hojas con lesiones con círculos concéntricos. En frutos verdes y maduros con lesiones y momificados se aisló *Colletotrichum* así como de tallos apicales con necrosis. Se encontró una amplia diversidad morfológica de colonias de *Colletotrichum* aisladas de cafeto y se seleccionaron 60 aislamientos para ser conservados, y se tomó una submuestra de 10 aislamientos para su identificación por morfología y molecular.

Abstract

From June to November 2013 samplings were made in three coffee producing municipalities of the northern state of Puebla, and were collected leaves, stems and fruits of Red Caturra Variety with necrosis symptoms or spots. The symptoms found were described and photographed. Disinfested symptomatic tissues were seeded in 2% malt extract agar and incubated in constant light near ultraviolet at room temperature and colonies were purified by monosporic culture. *Colletotrichum* was isolated of leaves with symptoms of necrosis and found the presence of *Cercospora* in association with *Colletotrichum* in leaf lesions with concentric circles. In unripe, ripe and mummified fruits *Colletotrichum* was isolated, as well as necrosis of apical stems. High morphological diversity of *Colletotrichum* isolated colony was found in coffee plants and 60 isolates were selected to be preserved, and a subsample of 10 isolates for identification and molecular morphology was taken.

1. Introducción

El cafeto es uno de los cultivos de mayor relevancia nacional por su importancia económica y social (Escamilla, 1993). Entre 2012 y 2013 se exportaron en promedio 175,000 t de café; 90% en grano (tostado o no) y un 10% en esencias (FND, 2014). En México el cafeto se produce en las cadenas montañosas del centro y sur del país, generalmente como policultivo bajo cubierta de un dosel de árboles, aunque también se han utilizado sistemas cafetaleros sin cubierta vegetal como monocultivo. En general la distribución que presenta este cultivo en el país es muy amplia y en una gran diversidad de climas, suelos y vegetación (Moguel y Toledo, 1996). Los principales estados productores de café son Chiapas, Veracruz y Puebla.

La Sierra Norte de Puebla es una región con gran diversidad biológica en donde la cafecultura ha tenido un papel relevante. En esta región el cultivo de cafeto se siembra entre los 300 y 1400 msnm. En algunas áreas cafetaleras, el cafeto sólo se siembra como cultivo de traspatio, sin embargo en municipios como Jalpan, Xicotepec y Zihuateutla existen fincas de cafeto (Evangelista-Oliva *et al.*, 2010).

Como en todo cultivo el cafeto se ve afectado por diversas plagas y enfermedades. Estas últimas son principalmente causadas por hongos, entre las que destaca *Colletotrichum* causando antracnosis en hojas, frutos y tallos (Haarrer, 1984).

Waller *et al.* (1993) y otros autores reportan que existe un amplio rango de especies de *Colletotrichum* que causan antracnosis en cafeto, incluyendo a *C. kahawae* J. M. Waller & P. D. Bridge que ocasiona la enfermedad desbastadora de las cerezas del cafeto o CBD (por sus siglas en inglés) en África. La enfermedad CBD afecta frutos verdes provocando su caída prematura y momificación de los frutos

dañados. Los síntomas de antracnosis causados por otras especies de *Colletotrichum* se parecen en menor intensidad a los de la CBD y se caracterizan por desarrollar lesiones hundidas de color café rojizo en frutos verdes y maduros, lo que interfiere con el proceso de producción de pulpa (Pinkert, 2004).

Colletotrichum se ha encontrado asociado a todos los órganos de la planta de café: hojas, flores, frutos y ramas. Los frutos verdes y maduros se momifican, las hojas, brotes tiernos y tallos apicales de plantas adultas se necrosan y las hojas se caen, lo que puede conducir a la muerte descendente de ramas (Ferreira *et al.*, 2009).

En México desde 1955 (CNC, 1955) se tiene conocimiento de los síntomas, daños y control de la enfermedad por *C. coffeanum* Noack en café y a partir de ese año se sigue enlistando como una de las enfermedades del café en México (Santoyo-Cortés *et al.*, 1995).

Waller *et al.* (1993) reanalizaron la Sistemática de esta especie de *C. coffeanum*, y consideraron que tal especie era un sinónimo de *C. gloeosporioides*. Al presente en Sistemática-taxonomía se desconoce a *C. coffeanum* y a su variedad, *C. coffeanum* var. *virulans* (Waller *et al.*, 1993) y que también fue referida en café en México por Topete (1966).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue identificar los hongos asociados con síntomas de antracnosis en hojas, ramas y frutos en plantaciones de café en Puebla.

Hipótesis

Los síntomas en hojas, frutos y de necrosis y muerte descendente de ramas están asociados a especies de *Colletotrichum* en las plantaciones de café en Puebla

2. Materiales y Métodos

2.1 Colecta de material vegetal con síntomas y selección de aislamientos.

Durante el verano y otoño del año 2013 se hicieron cinco muestreos en los municipios de Jalpan, Venustiano Carranza y Xicotepec ubicados en la zona norte del estado de Puebla (Cuadro 3). En estos municipios se colectaron muestras de hojas, frutos y ramas de la variedad Caturra Rojo con síntomas de antracnosis (Cuadro 3). En cada localidad se muestrearon cinco arbustos de café seleccionados al azar. De cada arbusto se colectaron 10 hojas, 10 frutos y 10 tallos con síntomas de antracnosis.

Las hojas, frutos y tallos con síntomas colectados se colocaron en bolsas de papel, previamente etiquetadas para ser transportados al laboratorio de Hongos Fitopatógenos del Colegio de Postgraduados. Una vez en el laboratorio las hojas se prensaron y se procedió al registro de las observaciones del material colectado.

Signos. Las hojas, frutos y ramas se examinaron con un microscopio estereoscópico Nikon® (SMZ800, JAPON) para observar signos como acérvulos, masa de conidios y setas del hongo. De cada signo encontrado se hicieron montajes de estructuras en ácido láctico al 85 %.

Aislamiento. Por cada una de las localidades muestreadas (Cuadro 3) se seleccionaron 10 hojas, 10 ramas, 10 frutos verdes y 10 frutos maduros para hacer los aislamientos, tres fragmentos de tejido sintomático por órgano se desinfectaron por inmersión con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Después de retirar el exceso de humedad en sanitas estériles los fragmentos se colocaron en cajas Petri de plástico estériles (90 x 15 mm) con medio de malta extracto agar (MEA) al 2 % + Ácido láctico (2 g de Malta extracto; OXOID®,

Inglaterra; 1 g de Agar HYCEL[®], México, por 100 mL de agua destilada, e incubaron en luz cercana a la ultravioleta (nUV). A los dos días se hicieron observaciones para registrar el desarrollo de las colonias en el medio y así estimar el porcentaje de aislamientos de *Colletotrichum*.

2.2 Identificación purificación y conservación de aislamientos

Todas las colonias fúngicas formadas se identificaron de acuerdo a sus características morfológicas con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) y el género *Colletotrichum* se identificó con ayuda de las claves de Sutton (1980). De las colonias donde se observaron conidios típicos de *Colletotrichum* se hicieron cultivos monospóricos para su purificación. En una caja de Petri con MEA al 2 % se colocó ± 2 ml de agua destilada estéril, en donde con ayuda de una aguja se distribuyó una alícuota de conidios. Después de dejarse reposar por 1-2 min se retiró el exceso de agua. Transcurridas 24 h de incubación a temperatura ambiente se hicieron observaciones en el microscopio estereoscópico para seleccionar tres conidios germinados con los cuales obtener los cultivos monospóricos en una nueva caja con medio (Crous *et al.*, 2009).

Por cada aislamiento monospórico obtenido se preparó una suspensión de conidios para su conservación en glicerol al 25 % en un ultracongelador (REVCO[®], USA) a -82 °C y en tubos inclinados de PDA (PDA; caldo de papa de 200 g, Dextrosa 15 g, Agar 20 g) con aceite mineral estéril para estudios posteriores (Crous *et al.*, 2009).

3. Resultados

3.1 Caracterización del material vegetal colectado y seleccionado

La ubicación de las siete localidades muestreadas en los municipios de Jalpan, Venustiano Carranza y Xicotepec del estado de Puebla; así como los aislamientos de *Colletotrichum* seleccionados para estudios de Sistemática (taxonomía y molecular), se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Número de aislamientos conservados y seleccionados de *Colletotrichum* por fecha de muestreo en 2013 y las características de las localidades en la zona norte del estado de Puebla de donde se obtuvieron las muestra vegetales.

| N* | A** | Fecha Muestreo | Estrato | Altitud msnm | Localidad | Coordenadas geográficas |
|----|----------------|----------------|---------|--------------|--|----------------------------------|
| - | - | jun-29 | Medio | 578 | Pozo del Tigre, Jalpan | 20° 25' 45" N 97° 52' 28" O |
| - | - | jun-29 | Medio | 620 | Tlaxcalantongo, Xicotepec | 97° 87' 27" N 20° 31' 50" O |
| 10 | 8 | ago-04 | Bajo | 229 | San Bartolo del Escobal, Venustiano Carranza | 20° 25' 29" N 97° 40' 06" O |
| 12 | 13, 21, 22 | ago-04 | Medio | 578 | Pozo del Tigre, Jalpan | 20° 25' 45" N 97° 52' 28" O |
| 9 | 27 | ago-04 | Alto | 956 | San Lorenzo, Xicotepec | 20° 20' 3.3" N 97° 56' 58" O |
| 6 | - | sep-22 | Bajo | 505 | Jalapilla, Xicotepec | 20° 22' 10" N 97° 54' 53" O |
| 9 | - | sep-22 | Medio | 810 | San Lorenzo, Xicotepec | 20° 21' 1.13" N 97° 56' 24" O |
| 7 | 38,41,42 51 | sep-22 | Alto | 1060 | Las Pilas, Xicotepec | 20° 19' 22" N 97° 57' 5.29" O |
| - | - | oct-26 | Bajo | 146 | Ejido el Ajengibre, Venustiano Carranza | 20° 25' 37" N 97° 40' 36" O |
| 2 | - | nov-10 | Bajo | 505 | Jalapilla, Xicotepec | 20° 22' 10" N 97° 54' 53" O |
| 1 | - | nov-10 | Medio | 810 | San Lorenzo, Xicotepec | 20° 21' 1.13" N 97° 56' 24" O |
| - | 60 | nov-10 | Alto | 1060 | Las Pilas, Xicotepec | 20° 19' 22" N 97° 57' 5.29" O |
| 4 | - | nov-10 | Alto | 1128 | Dos caminos, Xicotepec | 20° 13' 37" N 97° 55' 1.79" O |

60[▲] 10[▲]

*Número de aislamientos conservados por localidad

**Número de aislamientos monospóricos seleccionados para futura identificación de especies (cada número indica la clave de asignación).

- En Junio 29 se hicieron muestreos para observación de síntomas y reconocimiento del área, y en los otros muestreos también con: -, no se seleccionó algún aislamiento.

msnm = metros sobre el nivel del mar. ▲ Total de aislamientos.

3.2 Características de síntomas de tejidos muestreados

Las características de los síntomas en el tejido muestreado se describen a continuación.

Hojas. Los síntomas de hojas colectadas en campo se clasificaron de acuerdo a sus características en tres grupos: 1) Lesiones con círculos concéntricos en lámina foliar y en margen de hoja (Figura 3A); 2) Lesiones en margen de hoja con círculos concéntricos y con área necrótica extendida (Figura 3B); y 3) Área necróticas marginal en hoja (Figura 3C).

- 1) Las lesiones con círculos concéntricos fueron de color café-rojizo a café de 0.3 a 1.5 cm de diámetro, rodeadas de un halo amarillo, ubicadas principalmente en el centro y algunas en la periferia de las hojas.
- 2) Las lesiones del segundo grupo se encontraron con el mismo síntoma de círculos concéntricos pero rodeados de una área color café a negruzca de 1.0 a 1.5 cm (Figura 3B).
- 3) Área necrótica marginal o alargada color café, algunas veces gris claro, amorfa, de 1.0- 4.5 x 1-3 cm, y ubicada en el margen o ápice de la hoja.

Frutos en campo. En frutos verdes los síntomas registrados se caracterizaron por presentar manchas cafés rojizas hundidas, de 5 a 10 mm de diámetro (Figura 3D). En frutos maduros los síntomas observados en el pericarpio fueron manchas color café, circulares, las cuales se transformaron después en manchas negruzcas ovales, hundidas, de 3 a 10 mm de diámetro y en ocasiones abarcaron la mitad del fruto (Figura 3E). También se encontraron frutos necrosados con el pericarpio totalmente negro y arrugado con aspecto seco (Figura 3F).

Tallos en campo. En tallos de ramas apicales se encontraron manchas de color café oscuro de 3-4 x 0.3-0.5 cm (Figura 3G, 3H). También en ramas apicales se registraron lesiones de color café oscuro de 0.5 cm de ancho hasta 8 cm de largo, extendidas hacia la base del tallo. En algunas ocasiones se encontraron ramas con las puntas totalmente necrosadas y con frutos adheridos necrosados (Figura 3I). Los aislamientos obtenidos de los tallos necrosados fueron de tejidos apicales, de parte media y tejido basal.

A partir de los tejidos sintomáticos descritos anteriormente se obtuvieron los aislamientos de *Colletotrichum* indicados en el Cuadro 3.

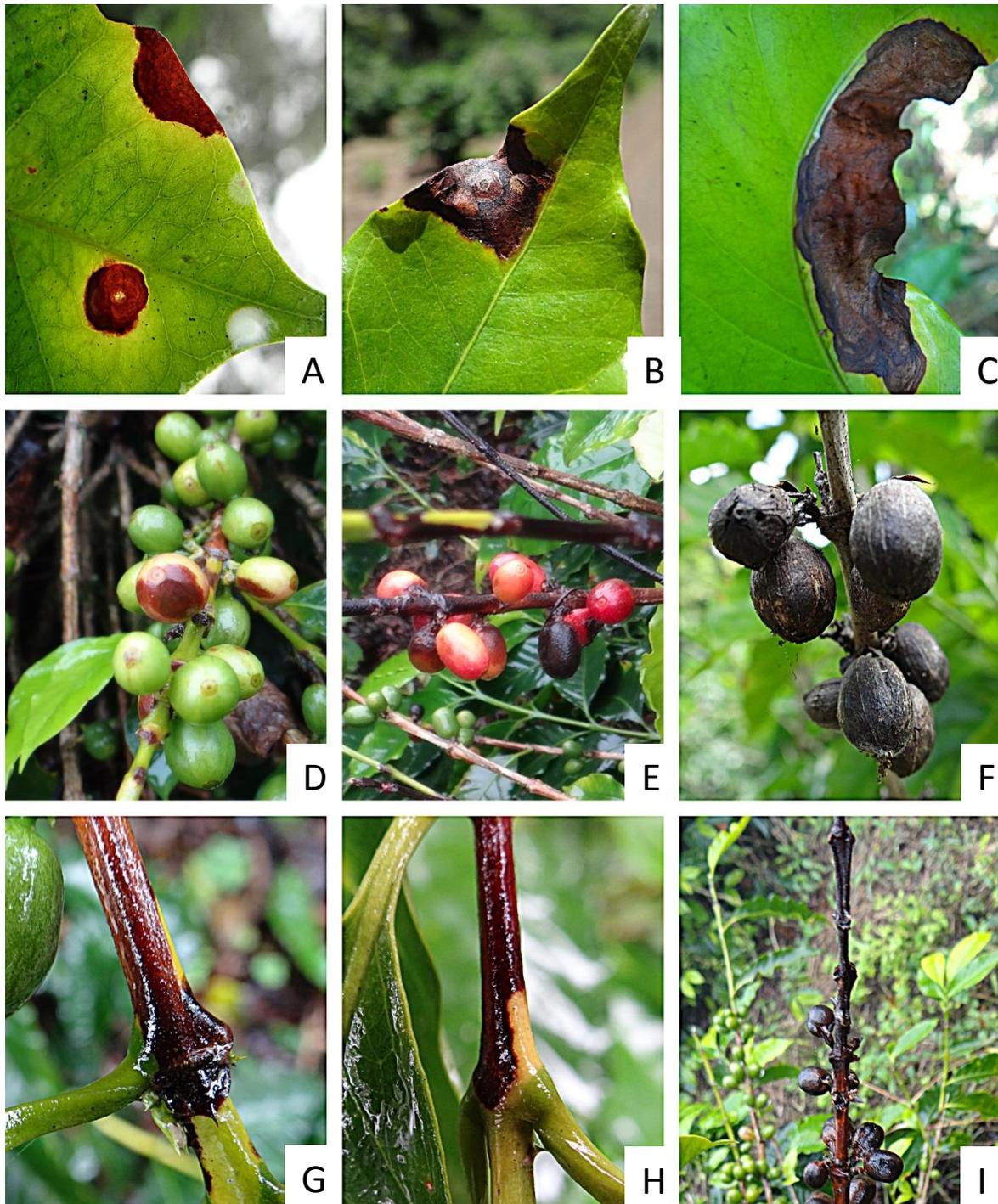


Figura 3. Síntomas de antracnosis en tejidos de plantas de cafeto en campo. **(A)** Hojas con círculos concéntricos y halo, **(B)** Hojas con círculos concéntricos y con área necrótica extendida y halo, **(C)** Áreas necróticas marginales y sin notorio halo, **(D)** Frutos verdes con manchas, **(E)** Frutos maduros con manchas, **(F)** Frutos 100 % necrosados, **(G, H)** Tallo de rama apical necrosado, **(I)** Tallo de rama apical sin hojas y con frutos y tallo necrosado.

Porcentaje de aislamientos de *Colletotrichum*

El porcentaje de aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos de tejido sintomático de los municipios de Jalpan, Xicoteppec y Venustiano Carranza se indica en el Cuadro 4.

En hojas con síntomas de círculos concéntricos, círculos concéntricos y áreas necróticas y área necrótica marginal se aisló *Colletotrichum* en 43, 55 y 70% respectivamente (Figura 3A-3C). Es decir predominaron los aislamientos del síntoma de hojas con áreas necróticas marginales (Figura 3C). De frutos verdes con manchas cafés (Figura 3D), frutos maduros con manchas cafés (Figura 3E) y frutos necrosados (Figura 3F) se aisló *Colletotrichum* en 31, 36 y 43% respectivamente. De tallos de ramas con necrosamiento en tejido apical, medio y basal (Figura 3G - 3I) el porcentaje de aislamiento fue de 57, 28 y 15 % (Cuadro 4).

Es importante resaltar que no se registró la presencia de acérvulos en ninguno de los tejidos sintomáticos observados en el microscopio estereoscópico.

Se obtuvieron cultivos puros de los aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos en los tres tipos de síntomas en hojas (Cuadro 4) predominando los aislamientos de necrosis marginal (Figura 3C; 70%), seguidos por los de hoja con círculos concéntricos (Figura 3A; 55 %). En este síntoma se observaron conidios de *Cercospora*. Este hongo se aisló en cultivo puro y se identificó a género con las claves de Ellis (1979).

Cuadro 4. Porcentaje de aislamientos de *Colletotrichum* de tejidos sintomáticos muestreados en la zona norte de Puebla en 2013.

| Tejido | # de fragmentos sembrados | # de colonias desarrolladas | Incidencia (%) | # del aislamiento [▲] seleccionado |
|--|---------------------------|-----------------------------|----------------|---|
| Hojas con círculos Concéntricos | 141 | 78 | 55 | 22 |
| Hojas con círculos concéntricos y áreas necróticas | 171 | 74 | 43 | 13, 27, 51 |
| Hojas con margen necrosado | 163 | 115 | 70 | * |
| Frutos verdes | 74 | 23 | 31 | 38, 41, 42 y 60 |
| Frutos maduros | 38 | 14 | 36 | 21 |
| Frutos necrosados | 30 | 13 | 43 | 8 |
| Tallo apical | 26 | 15 | 57 | * |
| Tallo medio | 38 | 11 | 28 | * |
| Tallo basal | 38 | 6 | 15 | * |
| TOTAL: | | | | 10 |

*Aislamientos no seleccionados por haber sido las colonias similares a otros aislamientos. [▲]Seleccionados según screen previo efectuado de las características culturales de las colonias y morfología de conidios *in vitro*.

3.3 Purificación y conservación de aislamientos

Del total de aislamientos desarrollados de cada síntoma (Figura 3; Cuadro 3), se conservaron 60 aislamientos de *Colletotrichum* que en un previo screen se observó desarrollaron colonias morfológicamente de apariencia diferente. La mayoría formaron colonias con masas de conidios de color salmón con crecimiento micelial moderado, otras blancas a grises con abundante crecimiento micelial y algunas colonias presentaron coloraciones negras, y otras con escaso micelio aéreo (Figura 4).

De los 60 aislamientos pre-seleccionados (Cuadro 3) se hizo una segunda subselección y se tomó una submuestra de 10 aislamientos (Cuadro 3, 4) para su

identificación morfológica y molecular por análisis multilocus en Cap. III. Tales 10 colonias seleccionadas se muestran comparativamente en Figura 4.

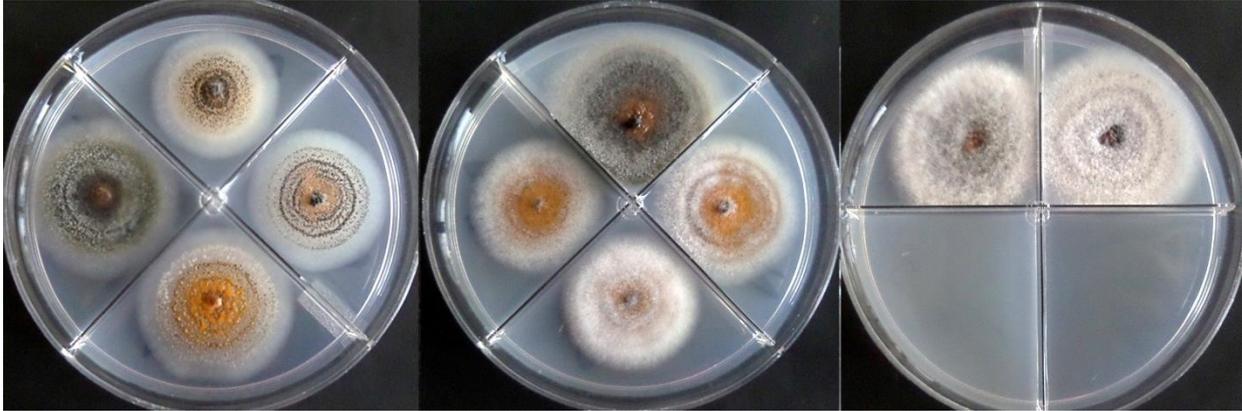


Figura 4. Colonias monospóricas de *Colletotrichum* de cuatro días de crecimiento en Papa Dextrosa Agar a temperatura ambiente bajo luz nUV. Las colonias se aislaron de plantas de café y son resultado de una pre-selección (screen) de 60 aislamientos para futuros análisis morfológicos y moleculares.

4. Discusión

Se encontró a *Colletotrichum* en todas las partes aéreas sintomáticas de antracnosis: hojas, frutos y ramas apicales de plantas de café. Lo anterior coincide con lo reportado por Ferreira *et al.* (2009) y otros autores en México (CNC, 1955) quienes reportaron que los síntomas de antracnosis se relacionaban con *Colletotrichum*. Los síntomas descritos en este estudio concordaron con las características de los síntomas de antracnosis indicados en café en México desde 1955 (CNC, 1955). Aunque en este estudio no se observaron acérvulos como señalado que son comunes en lesiones foliares (CNC, 1955). Esto puede indicar que las condiciones ambientales en 1955 en plantaciones de café posiblemente eran menos favorables para *Colletotrichum* y de ahí la formación de acérvulos como estructuras de reproducción asexual para perpetuar a *Colletotrichum*. En la actualidad tales condiciones son al parecer favorables al hongo o al menos en el año de este estudio, así como también la abundancia de hojas de café, posiblemente más susceptibles al presente, condiciones conjuntas (ambiente y hospedante) que tal vez permitan que *Colletotrichum* continúe en su fase vegetativa sin formar acérvulos en los tejidos de café infectados.

Además en hojas se encontró que existe una asociación entre *Cercospora* y *Colletotrichum* como señalado por diversos autores, en base que en lesiones causadas por *Cercospora* se aisló también a *Colletotrichum* y que según Nelson (2008) este es un hongo oportunista que aprovecha el daño de la lesión por *Cercospora* e invade el tejido de la lesión ocasionando y según lo observado, a que el síntoma se extienda y por lo tanto sea más severo el daño (Figura 3B). Topete (1966)

menciona que generalmente aparecen ataques simultáneos de mancha de hierro por *Cercospora* y antracnosis en cafetales establecidos en suelos pobres y con sombra escasa o nula. Postulados de Koch para definir los límites de síntomas causados por cada uno, y en combinación de los dos hongos, son deseables para delimitar los síntomas en forma individual. Aunque al parecer cuando en una lesión de *Cercospora* se establece *Colletotrichum*, se desarrolla y extiende un síntoma de necrosis-antracnosis que hay que estudiar.

5. Conclusiones

Se encontraron a *Colletotrichum* y *Cercospora* asociados con síntomas de antracnosis en lesiones de hojas; y a *Colletotrichum* solo en hojas ramas y frutos de cafeto.

Colletotrichum se encontró asociado con toda la parte aérea de la planta de cafeto. El síntoma típico de antracnosis en hojas fue necrosis marginal, en tallos apicales fue muerte descendente de ramas, y en frutos manchados y necrosis total. *Cercospora* se encontró presente solo en hojas con círculos concéntricos, rodeados de un halo amarillo.

Por lo que se acepta la hipótesis de que los síntomas en hojas y frutos, y de necrosis y muerte descendente de ramas en cafeto en Puebla están asociados a *Colletotrichum*.

6. Referencias

- Barnet, L.H., and B.B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- CNC. 1955. Comisión Nacional del Café. Manual práctico del cultivo de cafeto en México. México 216 p.
- Coelho, A.G.S., F.R. Ávila, L.A. Maffia, and E.G.M. Seiti. 2011. Infection Process of *Cercospora coffeicola* on Coffee Leaf. *Journal of Phytopathology* 159:6–11.
- Crous, P.W., G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, and R.A. Samson. 2009. Fungal Biodiversity. CBS. Laboratory Manual series 1, Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands. 269 p.
- Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes, Kew: Commonwealth Mycological Institute. 507 p.
- Escamilla, P.E. 1993. El Café Cereza en México: Tecnología de la Producción. Universidad Autónoma Chapingo. México 116 p.
- Evangelista-Oliva, V.J. López-Blanco, J. Caballero-Nieto y M.A. Martínez-Alfaro. Patrones espaciales de cambio de cobertura y uso del suelo en el área cafetalera de la sierra norte de Puebla 2010. *Boletín del Instituto de Geografía, UNAM*. 72:23-38.
- Ferreira, J.B., M. de Abreu, E. Alves, I.S. Pereira and K.D. Fernandes. 2009. Events of the infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves of *Coffea arabica* L. *Summa Phytopathologica* 35:273-281.
- FND. 2014. Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario Rural Forestal y Pesquero. Panorama del café. Disponible en: <http://www.financierarural.gob.mx/informacion>

[sectorrural/Panoramas/Panorama%20Caf%C3%A9%20%28may%202014%29.pdf](#). Consultado el 14 de mayo del 2015.

Haarrer, A.E. 1984. Producción Moderna de Café. Hill L. (ed). 2da edición. Editorial Continental. Mexico. 652 p.

Moguel, P. y V.M. Toledo. 1996. El café en México: ecología, cultura indígena y sustentabilidad. Ciencias 43:40-51.

Nelson, S.C. 2008. *Cercospora* leaf spot and berry blotch of coffee. Department of Plant and Environmental Protection Sciences Plant Disease. College of Tropical Agriculture and Human Resource. Disponible en: <http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/PD-41.pdf>

Pinkert, C. 2004. Nutrient & quality analysis of coffee cherries in Huong Hoa district, Vietnam. Wageningen: Plant Research International BV. 48 p.

Santoyo-Cortés, V.H., S. Díaz-Cárdenas, B. Rodríguez-Padrón. 1995. Sistema agroindustrial café en México. Diagnóstico, problemática y alternativas. México, Universidad Autónoma de Chapingo - CIESTAAM. México. 157 p.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 p.

Topete, P.E. 1996. Manual de Plagas y Enfermedades del Cafeto. Instituto Mexicano del Café. México. 70 p.

Waller, J.M., P.D. Bridge, B. Black, and G. Hakiza. 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen *Colletotrichum kahawae* sp. nov. Mycological Research 97:989-99.

CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y POR ANALISIS MULTILOCUS DE ESPECIES DE *Colletotrichum* EN CAFETO

Resumen

Se identificaron morfológicamente y por análisis multilocus una diversidad de cinco especies de *Colletotrichum* en plantas de cafeto: *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense*, y *C. theobromicola*, y una posible especie perteneciente al complejo *C. gigasporum* (*Colletotrichum* sp.), las cuales demostraron ser patogénicas en hojas de cafeto de la variedad Caturra Rojo, mostrando síntomas a los 14 días después de la inoculación. Para el análisis molecular se amplificaron tres regiones Actina, β -tubulina e ITS. La reconstrucción de la filogenia de cada marcador señaló la presencia de cinco grupos bien definidos en las muestras; sin embargo, Actin y β -Tubulina fueron las que diferenciaron las especies de *Colletotrichum*, mientras que ITS no ayudo a diferenciar a nivel de especie. No se encontró a la especie de *Colletotrichum* cuarentenada y esto es benéfico para los productores de cafeto.

Abstract

By morphology and multilocus analysis was identified a diversity of five species of *Colletotrichum* in coffee plants: *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense*, and *C. theobromicola* and one possible specie belonging to the complex *C. gigasporum* (*Colletotrichum* sp.). All of them proved to be pathogenic in coffee plant leaves Red Caturra variety, showing symptoms 14 days after inoculation. For molecular analysis three regions Actin, β -tubulin and ITS were amplified. The reconstruction of the phylogeny of each marker indicated the presence of five distinct groups in the samples. However β - tubulin and actin were those that differed *Colletotrichum* species, while ITS not differentiate species level. Quarantined *Colletotrichum* was not found and this is very beneficial for coffee tree producers.

1. Introducción

La identificación de especies de *Colletotrichum* anteriormente se basaba en la morfología y en menor grado en la asociación con el huésped (Hyde *et al.*, 2009). Un enfoque conjunto, utilizando análisis de secuencias combinadas o multilocus, junto con los datos morfológicos, ahora se recomienda para la identificación precisa de especies de este género (Cai *et al.*, 2009). Los estudios recientes, utilizan más de una región para la identificación con lo que se ha reevaluado las especies hacia complejos de especies, que han determinado que lo que antes se pensaba era una sola especie, comprende múltiples y distintos linajes (Damm *et al.*, 2012ab; Weir *et al.*, 2012).

Enfoques filogenéticos moleculares son cada vez más utilizados para caracterizar la diversidad en *Colletotrichum* (Moriwaki *et al.*, 2003), varios autores señalan que el uso de una sola región no es suficiente para la separación de las especies por lo que el uso de filogenia multilocus y conceptos de especie filogenética se están convirtiendo en una componente integral de su estudio sistemático (Taylor *et al.*, 2000). Actualmente las regiones que se han utilizado para la identificación de especies son ITS, beta tubulina, calmodulina, quitina sintasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, histona, etc. (Damm *et al.*, 2012ab; Weir *et al.*, 2012).

En México la CNC (1955) desde 1955 reporta *C. coffeanum*, actual especie no reconocida en Sistemática y se consideró un sinónimo de *C. gloeosporioides*, como la especie causante de la antracnosis en café, y no se ha realizado un estudio acerca de nuevas especies. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue identificar morfológica y por análisis multilocus las especies de *Colletotrichum* principalmente con

los genes de Actina, Beta-Tubulina e ITS y la adición de Calmodulina y GAPDH de plantaciones de cafeto en Puebla.

2. Materiales y Métodos

Los aislamientos se obtuvieron de hojas y frutos de plantas de café del estado de Puebla. El análisis morfológico y molecular se realizó en los laboratorios de hongos Fitopatógenos y en el laboratorio de biología molecular de Fitosanidad en el Colegio de Postgraduados en Montecillos, México.

2.1 Caracterización cultural y morfológica

Del total de aislamientos desarrollados de los tejidos muestreados, 60 aislamientos monospóricos fueron pre-seleccionados, se hizo un screen por morfología de conidios y de colonias en agar, y de los aislamientos con características contrastantes se tomó una sub-muestra de 10 para su identificación

2.2 Características culturales

Alicuotas de los aislamientos monospóricos se sembraron en punto en PDA, PDA 2 % (Damm et al. 2012b), SNA (Crous et al., 2009) más papel filtro, y Oatmeal extract agar (Crous *et al.*, 2009) e incubaron en diferentes condiciones de incubación en luz fluorescentes blanca (OSRAM, 40 W, Brasil), nUV (General Electric, 40 W, USA) u oscuridad constante por 12 h luz y 12 h oscuridad a diferentes temperaturas según los requerimientos de cada especie. Las colonias se examinaron a los 7 y 10 días para medir el diámetro en cm, describir las colonias (color, tipo de micelio, forma, etc.) por frente y reverso (Crous *et al.*, 2009) y medir estructuras morfológicas en μm , y a los 30 días para determinar la formación de peritecios.

2.3 Características morfológicas

Para el análisis de estructuras se hicieron montajes en ácido láctico y se observaron en un microscopio compuesto (Nikon Eclipse E-400, Japón) con objetivo de 100 X, y se midió en micrómetros el largo y ancho de los conidios, y en algunas especies el radio Largo/Ancho (L/A). La formación de apresorios se indujo por la técnica de cultivo en cubre objetos (Weir *et al.*, 2012) en la cual pequeños cubos de PDA se colocaron en un portaobjetos dentro de una caja Petri con una sanita húmeda. Posteriormente el borde del cubo se inoculó con conidios y se cubrió con un cubre objetos estéril, las cajas se colocaron bajo lámparas de luz fluorescentes blanca por 12 h luz y 12 h oscuridad. Después de 7 o 14 d se retiró el cubreobjetos y se añadió una gota de ácido láctico. Se registró la forma, color y tamaño de los apresorios.

2.4 Pruebas de patogenicidad

En invernadero se inocularon con herida y sin herida plántulas de seis meses de la Variedad Caturra Rojo. Previo a la inoculación las plantas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min y se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril, se dejaron secar al ambiente, y se colocaron en cámara húmeda. Se inocularon seis aislamientos: *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense*, *C. theobromicola* y *Colletotrichum* sp. (Nos. 41, 21, 13, 38, 8 y 51 respectivamente) con una suspensión de $\pm 50,000$ conidios/ml determinada con la cámara de New Bauer (Bright-Line®, Buffalo, NY, USA). Las plantas se mantuvieron durante un mes a temperatura de 22-29 °C y 80-100 % de humedad relativa. Las lesiones foliares desarrolladas se midieron, fotografiaron, describieron sus síntomas y

se hicieron los reislamientos en cultivo puro agar de tejidos sintomático como antes descrito.

2.3 Caracterización molecular

2.2.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de los 10 aislamientos se utilizó el protocolo de Castellanos (2013) con algunas modificaciones, que consistieron en utilizar 500 µl de buffer (NaCl, Tris-HCl, SDS) y 10 µl de proteinasa QUIAGEN para la extracción.

2.2.2 Amplificación de los genes ITS, β-tubulina y actina

Para el análisis multilocus se amplificaron tres genes: Actina (ACT-512F / ACT-783R; Carbone and Kohn 1999), Beta tubulina (Bt2a / Bt2b; Glass and Donaldson, 1995), y los rDNA de las regiones internas ITS (ITS1 / ITS4; Gardes and Bruns 1993; White et al. 1990); en adición para algunos aislamientos se amplificaron los genes CAL (CL1/CL2A) y GAPDH (GDF/GDR) (Weir et al., 2012). Las condiciones para la amplificación de cada una de las regiones fue diferente, para ITS y consistieron en una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 48 °C y 60 s a 72 °C, con una extensión final de 72 °C por 10 min (Woudenberg *et al.*, 2009). Para β-tubulina las condiciones de amplificación fueron las siguientes una etapa de desnaturalización de 3 min a 95 °C seguido de 34 ciclos a 95 °C durante 1 min, 52 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min y un ciclo final de 10 min a 72 °C (Prihastuti *et al.*,2009). Para actina las condiciones para la amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 52°C y 30 s a 72 °C, y una etapa de desnaturalización final de 7 min a 72 °C (Damm *et al.*, 2012a).

2.2.3 Análisis filogenético de secuencias

Los productos amplificados se secuenciaron en dos direcciones por MACROGEN en Korea. Las secuencias se analizaron con DNASTAR (2001) y Sequencher (5.3), y el alineamiento fue con Clustal W en MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013). La comparación con otras secuencias se realizó con Blastx en BLAST del NCBI. De donde se obtuvieron 10 secuencias para la reconstrucción de la filogenia, y se bajaron de NCBI secuencias de *C. kahawae* para conocer dónde se agrupa esta especie cuarentenada. Previo a la re-construcción se realizó una prueba de modelos de sustitución de nucleótidos en MEGA 6.0. Los números de accesión de las secuencias de este estudio se enlistan en el Cuadro 5.

La reconstrucción de la filogenia se implementó en MEGA 6 y donde se cortaron los extremos de las secuencias. El análisis filogenético se realizó de forma independiente para cada gen y región, con el método de Neighbor-Joining (NJ) y modelo de sustitución de nucleótidos que se obtuvo fue K2 (Kimura 2 parámetros) para ITS y Actin, y T3 (Tamura 3 parámetros) para β -tubulina. El análisis concatenado de los dos genes y regiones ITS fue con el modelos T3 (Tamura 3 parámetros) con BIC (Bayesian Information Criterion) en todos los casos se realizó un “bootstrap” de 500 repeticiones. Los árboles se generaron sin raíz.

3. Resultados

Los diez aislamientos analizados correspondieron a cinco especies, más una no identificada. Del complejo de especies de *C. boninense*: *C. karstii*; y del complejo de *C. gigasporum*: *C. gigasporum* y una posible especie de este complejo, *C. sp.*; del complejo de especies de *C. gloeosporioides*: *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, y *C. theobromicola*, y éstas se describen abajo. Del lugar de colecta, tejidos donde se aislaron y sus números de accesión de las secuencias se enlistan en Cuadro 5.

3.1 Caracterización morfológica

C. gigasporum E. F. Rakotoniriana & F. Munaut.

Colonias en PDA a 25 °C en oscuridad continua a los 7 d, de 8.0 cm de diámetro, micelio aéreo gris, denso, algodonoso y margen blanquecino, y reverso de colonia negro; a las dos semanas abundantes conidiomas acervulares en periferia del plato con masa de conidios rosa palido a gris palido con la edad, abundantes setas café claro a oscuro, septadas con ápice redondo o truncado, pared apical rugosa, 90-140 x 5-6 µm; célula conidiogénica fialídica, cilíndrica; conidia cilíndrica, hialina, gutulada, recta, ambas terminaciones redondeadas, 20-26 (29) x 7-8 µm; apresorios cafés, clavate a ovals e irregulares, crenados o margen lobulado y con un poro germinativo, (10-) 12.5-17.5 (-22.5) x 7.5-12.5 µm. Teleomorfo no observado. El BLAST fue de 99.6-100 % con *C. gigasporum* (Rakotoniriana *et al.*, 2013).

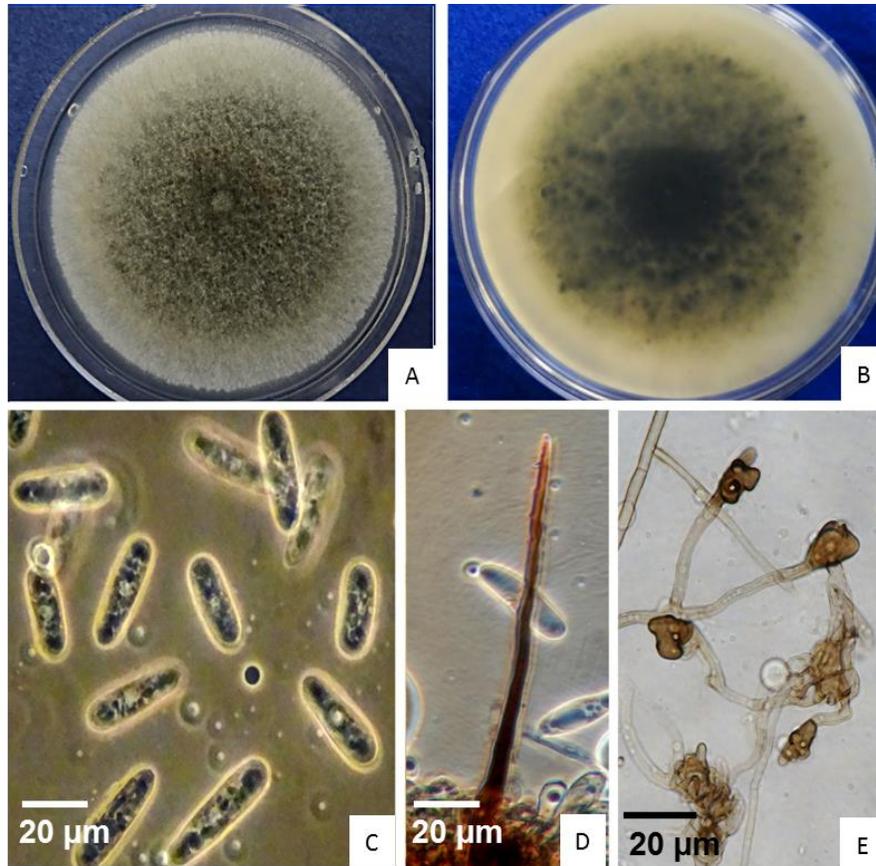


Figura 5. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum gigasporum*. **(A)** Frente **(B)** Reverso de una colonia (grisacea); 7d en PDA a 25 °C, oscuridad continua, **(C)** Conidios (en contraste de fases), **(D)** Setas, **(E)** Apresorios; barra = 20 µm.

C. gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc.

Colonias en PDA a 20 °C en luz fluorescente y nUV 12 h/oscuridad 12 h a los 7 d, de 4.8-5.0 cm y a los 10 d de 7.0-7.5 cm, micelio abundante algodonoso, gris oscuro con margen blanquecino y conidiomas al centro de la colonia con masa de conidios color salmón; reverso de la colonia beige con áreas negruzcas en arreglo zonado. En mismo medio y en condiciones ambientales de laboratorio colonias a los 7 d de 6.4-6.6 cm de diámetro, planas, centro de la colonia micelio aéreo algodonoso

denso y gris, resto de la colonia ligero algodonoso blanquecino a ligeramente gris y margen ligero erose y blanquecino; reverso salmón pálido a naranja y centro con manchas oscuras grisáceas y margen beige pálido a blanquecino, abundantes conidiomas anaranjados, raras setas café; conidios cilíndricos y algunos subcilíndricos, con extremos redondeados y algunos con ligera base truncada, gutulados, 13-16 x 5-6 μm , L/A: 2.6; apresorios café, ovoides a clavados lobulados con un poro germinativo, (4.6-) 7.6-9.7 (-13.7) x 4.4-7.9 (9.8) μm . Teleomorfo no observado. Con los cinco genes el BLAST fue de 100 % con *C. gloeosporioides*. La descripción morfológica concordó con Cannon *et al.* (2008) y Liu *et al.* (2013).

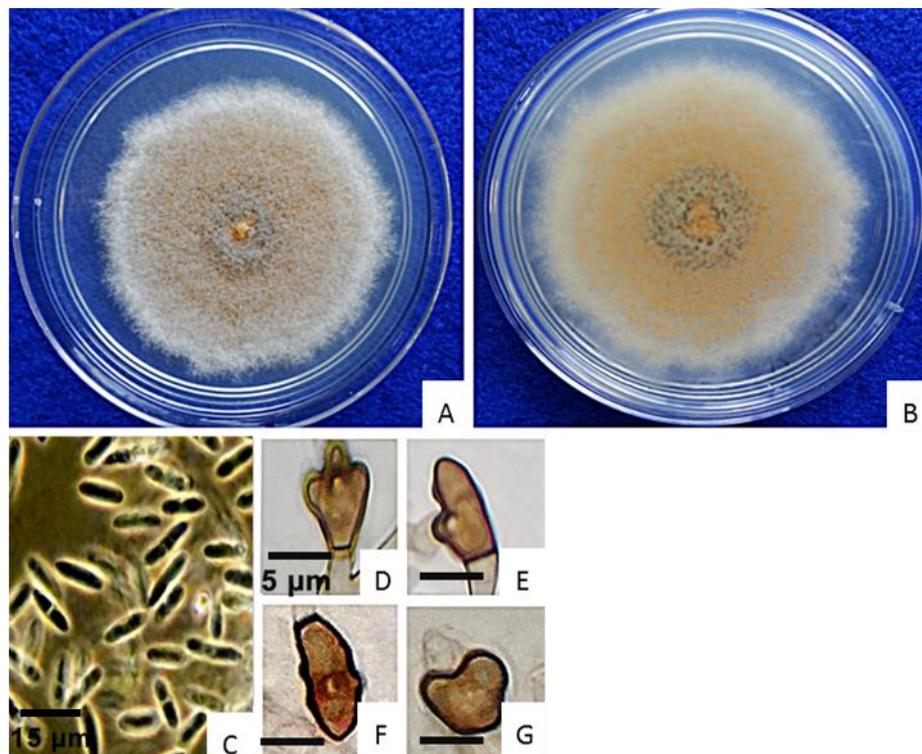


Figura 6. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Frente, **(B)** Reverso de una colonia; 7d en PDA y condiciones ambientales de laboratorio, **(C)** Conidios (en contraste de fases); barra = 15 μm , **(D,E,F,G)** Apresorios; barra = 5 μm .

Colletotrichum sp.

Colonias en PDA a 25 °C en oscuridad a los 7 d, de 8.0 cm de diámetro, aerial micelio gris lanoso (menos denso y de menor altura que en aislamiento No. 41; Cuadro 1) y con abundantes estructuras dispersas y semi-inmersas, redondeadas, y conformadas por un centro de masa compacta de hifas de consistencia algo dura y recubiertas de abundante micelio algodonoso; margen de colonia blanquecino y reverso negruzco; a las dos semanas en superficie de estructuras de textura compacta o endurecida, células conidiogénicas y conidios en masas mucilaginosas negruzcas, setas no observadas; conidios hialinos, gutulados, cilíndricos y algunos clavate, rectos y algunos algo curvados, con ambas terminaciones redondeadas y algunos truncados con hilum marcado, aseptados y con uno o dos septos en algunos conidios envejecidos, (11-) 15-27 (-28) x (5-) 6-8 (-9) μm , y en alternada luz blanca fluorescente /nUV por 12 h, misma morfología descrita y el tamaño de conidios incremento, (19-) 20-32 (-33) x 6-8 μm ; apresorios cafés ovoides, lobulados, con poro germinativo, (6-) 8-17.5 (-20) x 4-7 (-10) μm . Teleomorfo no observado. En el BLAST solo el gen actina mostró una diferencia de cuatro nucleótidos de este aislamiento en alineamiento con *C. gigasporum* y con 98.8 %, y tal diferencia se reflejó en los conidiomas, y tamaño y forma de los conidios. Se requiere estudiar en otras condiciones de incubación.

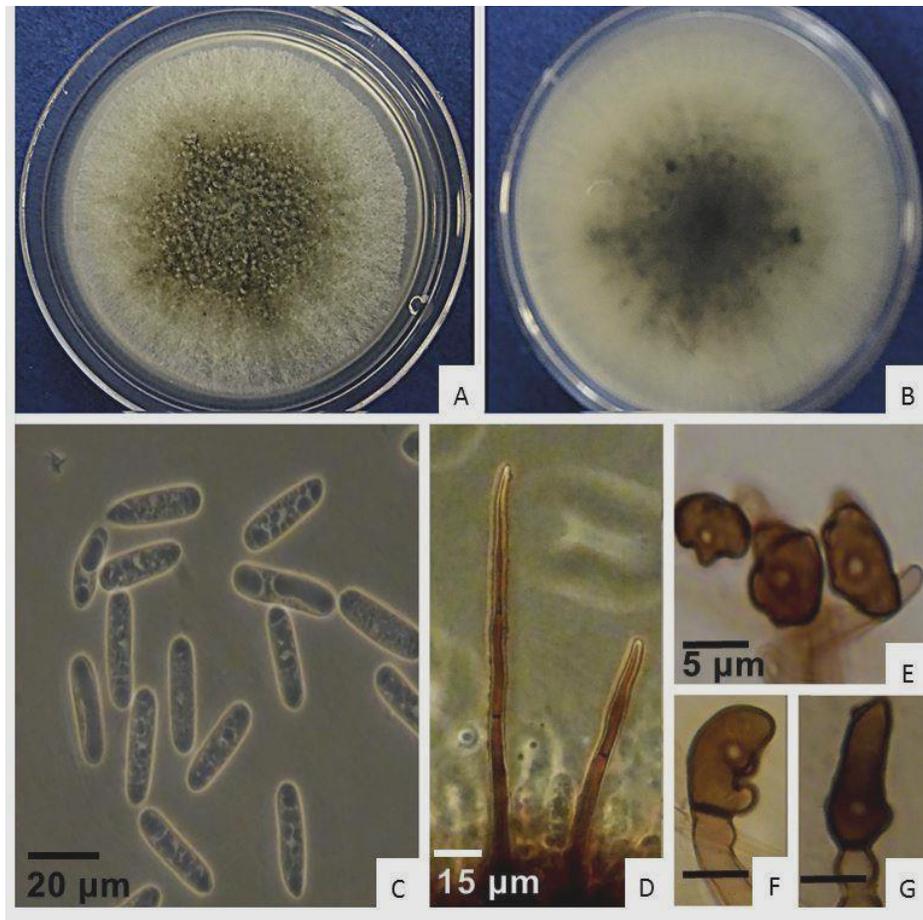


Figura 7. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum* sp. **(A)** Frente, **(B)** Reverso de una colonia (grisacea); 7d en PDA a 25 °C y oscuridad continua, **(C)** Conidios (en contraste de fases); barra = 20 µm, **(D)** Setas; barra = 15 µm **(E,F,G)** Apresorios; barra = 5 µm.

C. karstii Y.L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai.

Colonias en PDA a 20 °C, en luz fluorescente y nUV 12 h/oscuridad 12 h a los 7 d, de 3.7-4.3 cm y a los 10 d, de 5.4-6.5 cm, micelio algodonoso blanquecino a abundante al centro y moderado en el resto de colonia, zonado; reverso de colonia salmón pálido a tenue naranja con zonación oscura; abundante conidiomata acervular y masa de conidios salmón a tenue naranja; conidios con citoplasma granulado, rectos, cilíndricos con extremos redondeados y algunos con ápice redondeado y base

truncada, hilum prominente, (12-) 13-17 (-18) x 5-6 μm ; en SNA, nUV 12 h/oscuridad 12 h a 20 $^{\circ}\text{C}$, conidios de menor tamaño, (11-) 12-14 x 5-6 μm ; apresorios cafés ovoides, elipsoidales subglobosos, con poro germinativo, (-4.9) 6.9-12.6 (-18) x (3.4-) 4.4-7.5 μm ; setas ausentes, en PDA peritecios observados a los 30 d. El BLAST fue con esta misma especie con 99.6 a 100 % excepto un aislamiento que se alineo en 98.6 % por el gen actina. La descripción concordó con Damm *et al.* (2012b) y Yan *et al.* (2011).

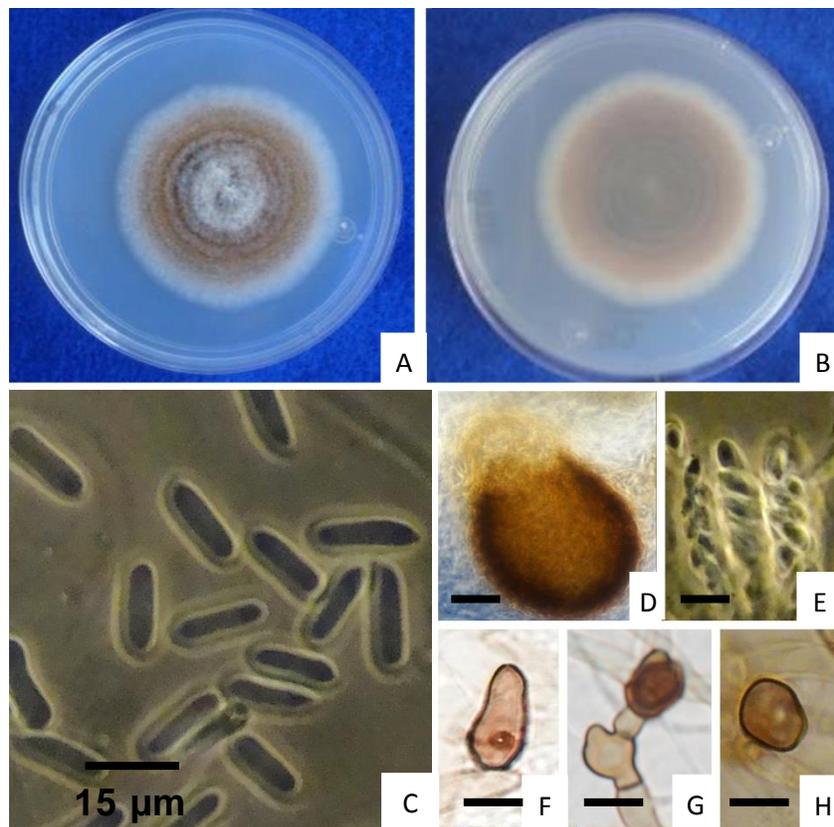


Figura 8. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum karstii* (A) Frente, (B) Reverso de una colonia; 7d en PDA a 20 $^{\circ}\text{C}$, nUV 12 h/oscuridad 12 h, (C) Conidios (en contraste de fases); barra = 15 μm , (D) Peritecio; barra = 30 μm , (E) Ascas y ascosporas; barra = 20 μm , (F,G,H) Apresorios; barra = 5 μm .

C. siamense Prihastuti, L., Cai & K.D. Hyde.

Cultivos en PDA a 28 °C, en oscuridad a los 7 d, de 8.0 cm de diametro, entre aislamientos aerial micelio algodonoso de moderado a abundante y ligeramente grisáceo-blanquecino o cafésoso; reverso pálido amarillento-beige a naranja, abundantes conidiomatas amarillentos a naranjas, conidios fusiformes y algunas oblongos, rectos, hialinos, 12-18 (-19) x 4-5 µm; apesorios cafés, ovoides a clavados algunos subglobosos, con poro germinativo, 5.3-9.0 (-13.4) x 3.9-5.9 (-7.7) µm; setas presentes al centro de colonia o ausentes. Teleomorfo no observado. El BLAST fue con *C. siamense* con 99.1-100 %, excepto con actina y GAPDH que en dos aislamientos fue de 98.5 y 98.9 %. La descripción concordó con Prihastuti *et al.* (2009).

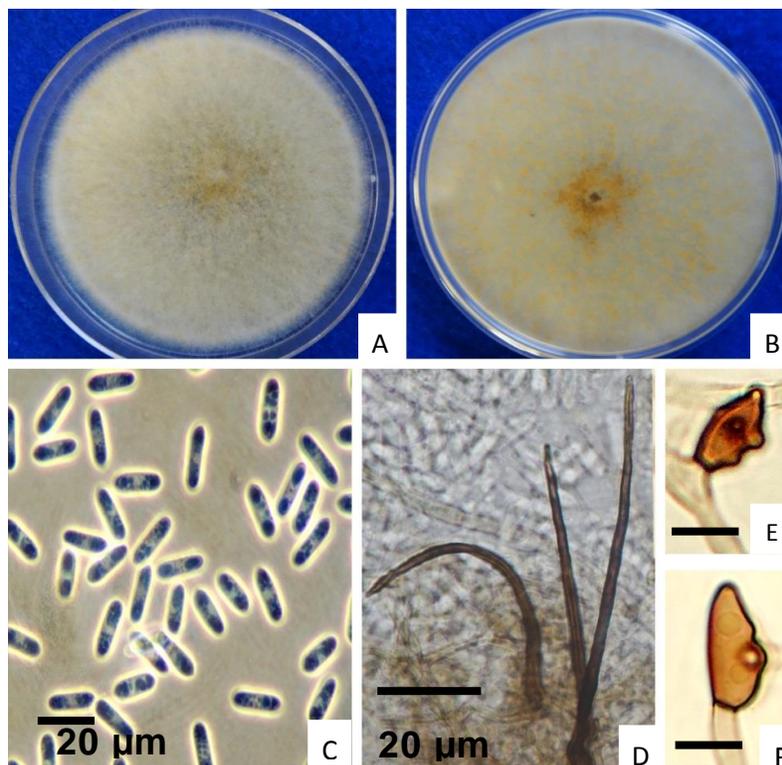


Figura 9. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum siamense*. **(A)** Frente, **(B)** Reverso de una colonia; 7d en PDA a 28 °C, oscuridad continua, **(C)** Conidios (en contraste de fases); barra = 20 µm, **(D)** Setas; barra = 20 µm, **(E, F)** Apesorios; barra = 5 µm.

C. theobromicola Delacr.

Colonias en PDA a 25 °C, en 12 h luz/12 h oscuridad a los 4 d, de 4.61 cm de diámetro y a los 10 d micelio denso algodonoso gris oscuro en círculos concéntricos; abundantes conidiomas en los círculos con masa de conidios naranja, reverso de colonia gris oscuro; en SNA a los 10 d micelio hialino, inmerso y ligeras hifas hialinas aéreas, dispersos conidiomas en agar y notorios en papel filtro con masa de conidios naranja; conidios en SNA por 10 d en condiciones ambientales de lab. y en montaje con KOH al 3 %, rectos, 13-19 x (-3) 4-5 μ m, L/A: 3.25-3.8, subcilíndricos y algunos clavados; apresorios en SNA cafés, algo irregulares con margen lobulado, algunos proliferados, (7-) 9-11 x 6-8 (-9) μ m; setas y teleomorfo no observados. La descripción concordó con Rojas et al. (2010). El BLAST en NCBI fue de 99.6-100 % de similitud con *C. theobromicola*.

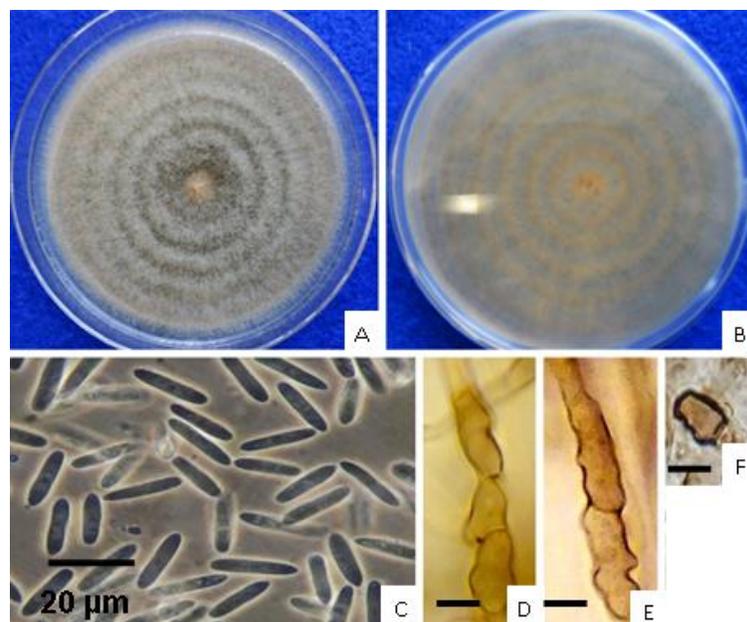


Figura 10. Características culturales y estructuras formadas por *Colletotrichum theobromicola* (A) Frente, (B) Reverso de una colonia; 4d en PDA a 25 °C, luz blanca 12 h/oscuridad 12 h, (C) Conidios (en contraste de fases); barra = 20 μ m, (D, E) Apresorios proliferados; barra = 5 μ m. (F) Apresorio individual; barra= 5 μ m.

Cuadro 5. Especies de *Colletotrichum* identificadas en el cultivo de café variedad Caturra Rojo en zona norte de Puebla.

| A* | Especie | Cultivo | Tejido | Localidad | Altitud msnm | Números de accesión GenBank | | | | |
|----------------------------|---------------------------|----------|-------------------|----------------------|-----------------|-----------------------------|----------|------------|----------|----------|
| | | | | | | Actina | TUB2 | Calmodulin | GAPDH | ITS |
| Jalpan** | | | | | | | | | | |
| 13 | <i>C. karstii</i> | CP-CC029 | Hoja ¹ | P. T. ^d | 578 | KT122920 | KT122910 | | | KT122930 |
| 21 | <i>C. gloeosporioides</i> | CP-CC032 | FM ⁴ | P. T. | 578 | KT122923 | KT122913 | KT122943 | KT122939 | KT122933 |
| Venustiano Carranza | | | | | | | | | | |
| 8 | <i>C. theobromicola</i> | CP-CC028 | FM ⁵ | S. B. E ^e | 229 | KT122919 | KT122909 | | | KT122929 |
| Xicotepec | | | | | | | | | | |
| 22 | <i>C. siamense</i> | CP-CC035 | Hoja ² | S. L. ^a | 956 | KT122926 | KT122916 | | KT122940 | KT122936 |
| 27 | <i>C. siamense</i> | CP-CC036 | H ¹ | S. L. | 956 | KT122927 | KT122917 | | KT122941 | KT122937 |
| 38 | <i>C. siamense</i> | CP-CC037 | FV ³ | L. P. ^b | 1060 | KT122928 | KT122918 | | KT122942 | KT122938 |
| 41 | <i>C. gigasporum</i> | CP-CC033 | FV ³ | L. P. | 1060 | KT122924 | KT122914 | | | KT122934 |
| 51 | <i>C. sp.</i> | CP-CC034 | Hoja ¹ | L. P. | 1060 | KT122925 | KT122915 | | | KT122935 |
| 42 | <i>C. karstii</i> | CP-CC030 | FV ³ | L. P. | 1060 | KT122921 | KT122911 | | | KT122931 |
| 60 | <i>C. karstii</i> | CP-CC031 | FV ³ | D. C. ^c | 1128 | KT122922 | KT122912 | | | KT122932 |

*Número de aislamiento **Municipios ¹En lesión atípica de *Cercospora*. ²En lesión típica de *Cercospora*. ³ Fruto verde sintomático ⁴ Fruto maduro sintomático ⁵Fruto momificado.

^aSan Lorenzo: 20°20'3.3" N, 97°56'58" O; ^bLas Pilas: 20°19'22" N, 97°57'5.29" O; ^cDos Caminos: 20°13'37" N, 97°55'1.79" O; ^dPozo del Tigre: 20°25'45" N, 97°52'28" O; ^eSan Bartolo del Escobal: 20° 25' 29" N, 97°40'06" O.

3.2 Pruebas de patogenicidad

Los seis aislamientos, uno de cada especie identificada, fueron patogénicos en hojas de cafeto registrando síntomas a los 14 días después de la inoculación (ddi).

Las lesiones en plantas sin herida fueron de color café y se formaron en el ápice y bordes de las hojas; al principio pequeñas lesiones circulares de hasta 1.0 cm de diámetro, y luego se alargaban por el borde de las hojas, 3 x 2-5 cm (Figura 11A, B, C). En hojas con herida el síntoma iniciaba como una pequeña lesión circular de 0.5 a 1.5 cm de diámetro de color café claro para después alargarse en la hoja y tomar un color café a negro, en ocasiones al centro color grisáceo, y algunas deformaban la hoja (Figura 11D, E, F). En las hojas con lesiones se formaron acérvulos. Los mismos aislamientos con los que se inoculó se recobraron en cultivo puro. De testigos no se aisló ninguna colonia de *Colletotrichum*.

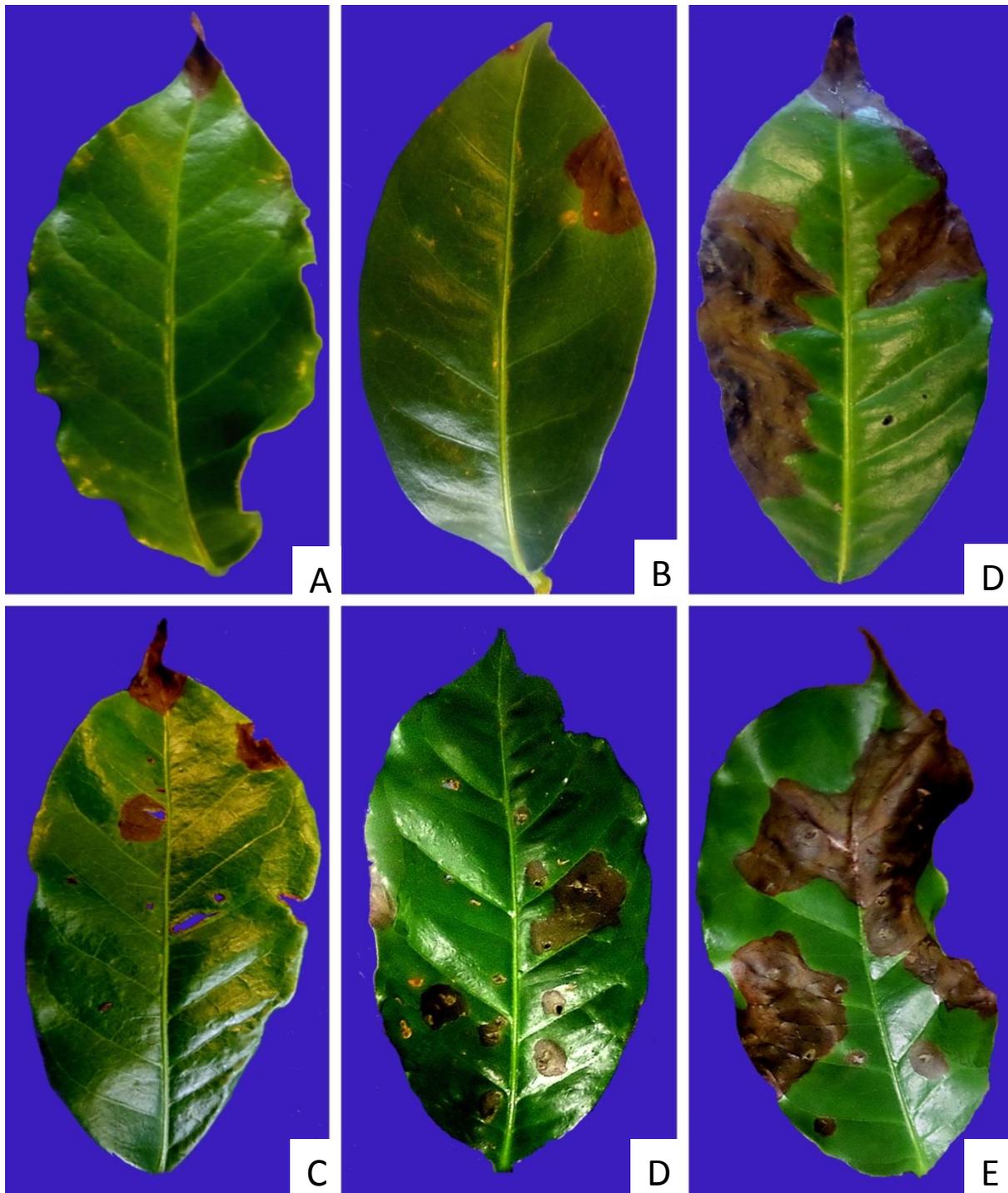


Figura 11. Síntomas de antracnosis en hojas inoculadas de cafeto de la variedad Caturra Rojo. (A,B,C) Hojas sin herida, (D,E,F)Hojas con herida, (A,B) Síntomas de necrosis en ápice y bordes a los 14 ddi, (C)Síntomas a los 30 ddi. (D,E) Síntomas en heridas a las 14 ddi, (F) Síntoma de necrosis en hojas a los 30 ddi.

3.3 Caracterización molecular

3.3.1 Análisis filogenético de secuencias

Las secuencias de cada aislamiento se leyeron en DNASTAR y en Sequencher y alineadas se compararon con el GenBank mostrando una similaridad de hasta el 100% con algunas especies (Anexo A). De las cuales se seleccionaron 10 de cada región para el análisis de la filogenia.

El análisis de la región de actina, señala la presencia de cinco grupos bien definidos, los grupos que se forman corresponden a las especies identificadas morfológicamente, y en el caso de la especie no identificada que corresponde al aislamiento 51 (*Colletotrichum* sp.) la ubica dentro del grupo de *C. gigasporum*.

Los resultados de la región de β -tubulina señalan el mismo patrón de diversificación de las especies que la región de actina, incluso con un mayor soporte de ramas en los grupos y en especial para *C. siamense*, que en actina es de 59% y en β -tubulina es del 78% de que sea correcto, lo que puede indicar que ocurre una menor variación dentro de las especies que se forman.

Por otro lado el análisis de la región de ITS señala un patrón de diferenciación diferente al de la región de actina y β -tubulina, aunque si se forman los cinco grupos al igual que en las otras dos regiones analizadas. Además de que secuencias de diferentes especies se alinearon con los aislamientos de este trabajo como es el caso de *C. gigasporum* que se alineo con *C. taiwanensis*, y *C. nicotianae* con *C. karstii*.

Finalmente el análisis de multilocus de las regiones de actina, β -tubulina e ITS de las secuencias que se obtuvieron en este estudio señala el mismo patrón de diversificación que actina y β -tubulina.

Por lo que con base en este análisis se puede señalar que el uso de las tres regiones correspondieron a las especies identificadas morfológicamente, y que β -tubulina y actina fueron más distintivas en la búsqueda de secuencias similares en el banco de genes en tanto que ITS presenta confusión por alinearse con más de una especie.

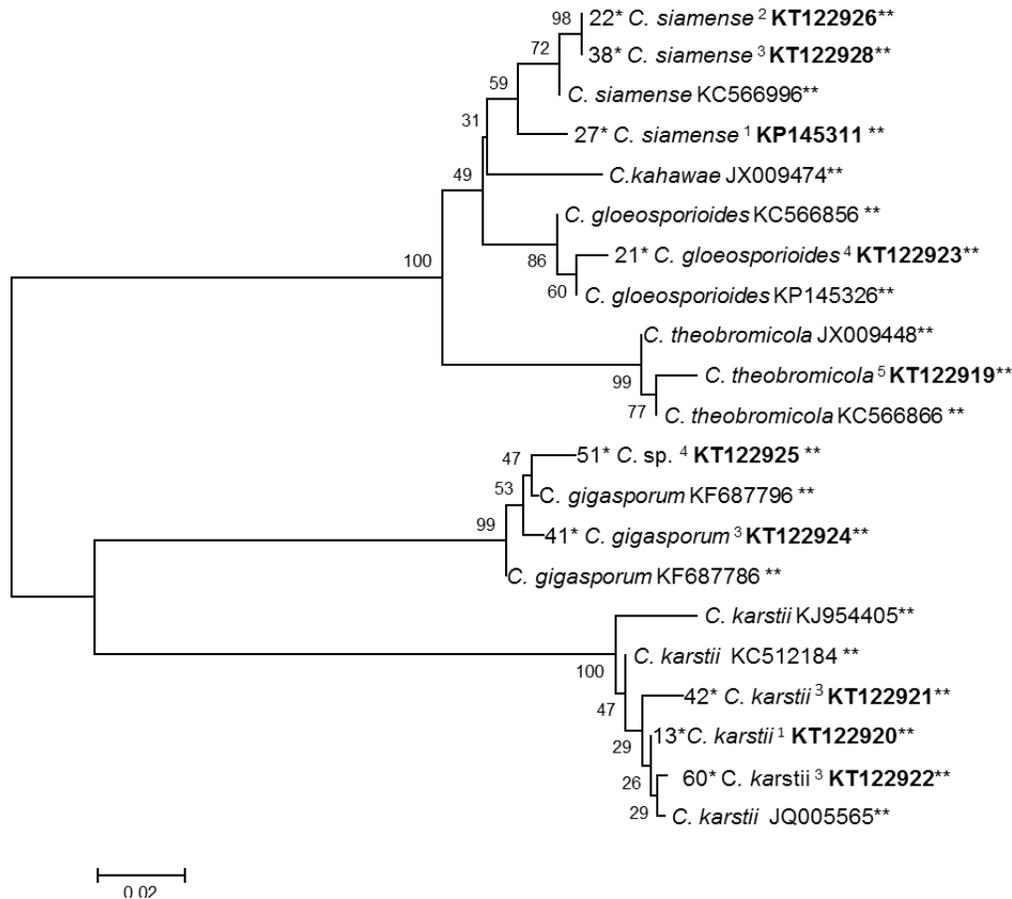


Figura 12. Reconstrucción filogenética de *Colletotrichum* de la región de **Actina** con el método de Neighbor-Joining (NJ) con modelo K2 (Kimura 2 parámetros) y 500 repeticiones de Bootstrap de 20 secuencias, 10 de este estudio (en bold) y 10 de las alineadas en mayor índice de similaridad, cobertura y score, y una secuencias de *C. kahawae* del banco de genes. Árbol construido sin raíz. *Número de aislamiento. **Numero de accesoión en GenBank. ¹En hoja con lesión atípica de *Cercospora*. ²En hoja con lesión típica de *Cercospora*. ³ Fruto verde sintomático. ⁴ Fruto maduro sintomático. ⁵ Fruto momificado.

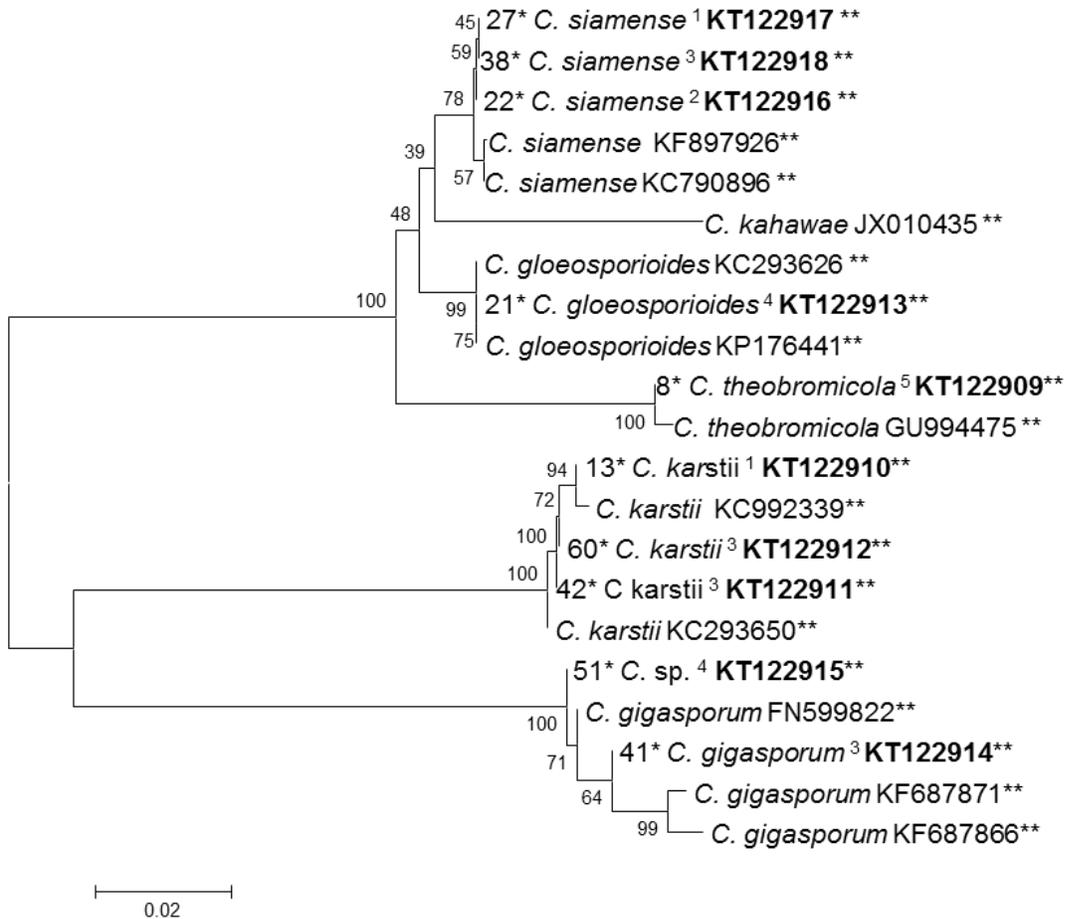


Figura 13. Reconstrucción filogenética de *Colletotrichum* de la región de β -tubulina con el método de Neighbor-Joining (NJ) con modelo T3 (Tamura 3 parámetros) y 500 repeticiones de Bootstrap de 20 secuencias, 10 de este estudio (en bold) y 10 de las alineadas en mayor índice de similitud, cobertura y score, y una secuencias de *C. kahawae* del banco de genes. Árbol construido sin raíz. *Número de aislamiento. **Numero de accesoión en GenBank. ¹En hoja con lesión atípica de *Cercospora*. ²En hoja con lesión típica de *Cercospora*. ³ Fruto verde sintomático. ⁴ Fruto maduro sintomático. ⁵ Fruto momificado.

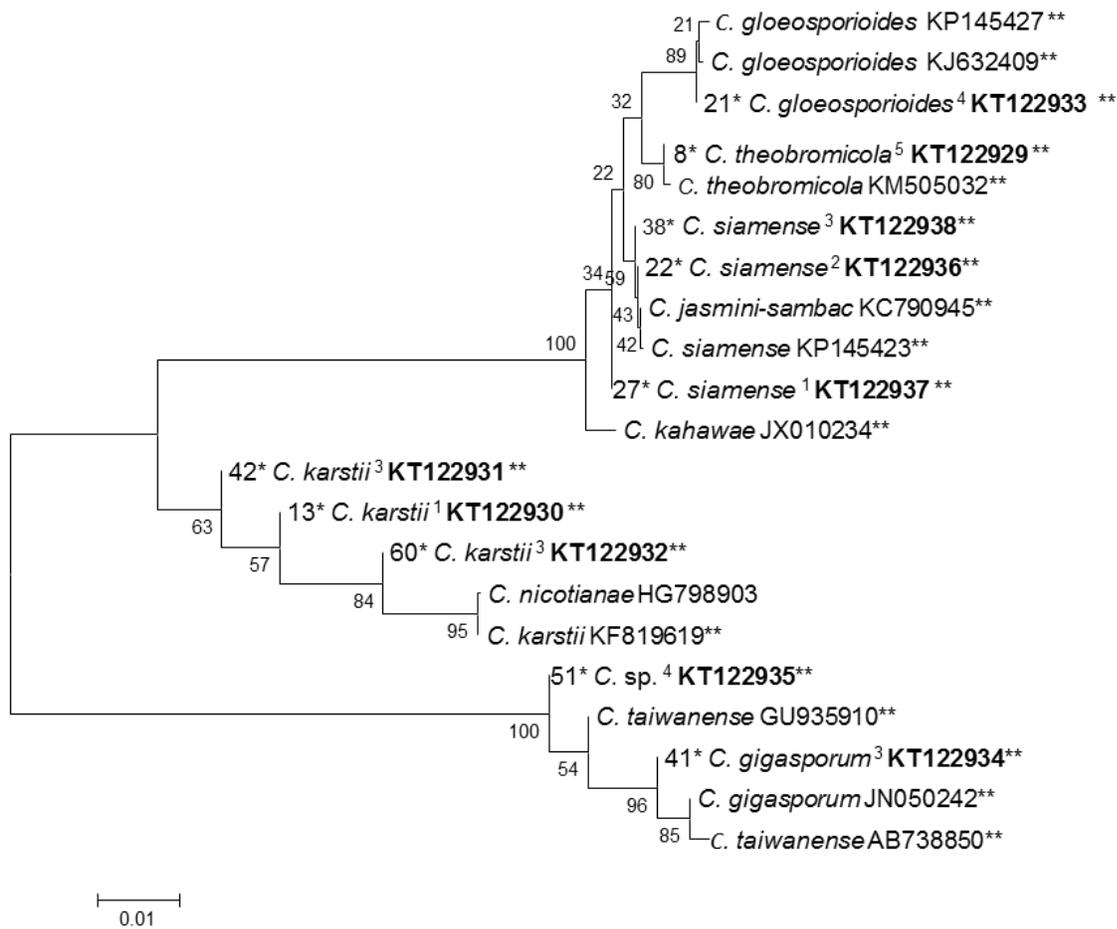


Figura 14. Reconstrucción filogenética de *Colletotrichum* de la región de ITS con el método de Neighbor-Joining (NJ) con modelo K2 (Kimura 2 parámetros) y 500 repeticiones de Bootstrap de 20 secuencias, 10 de este estudio (en bold) y 10 de las alineadas en mayor índice de similaridad, cobertura y score, y una secuencias de *C. kahawae* del banco de genes. Árbol construido sin raíz. *Número de aislamiento. **Numero de accesión en GenBank. ¹En hoja con lesión atípica de *Cercospora*. ²En hoja con lesión típica de *Cercospora*. ³ Fruto verde sintomático. ⁴ Fruto maduro sintomático. ⁵Fruto momificado.

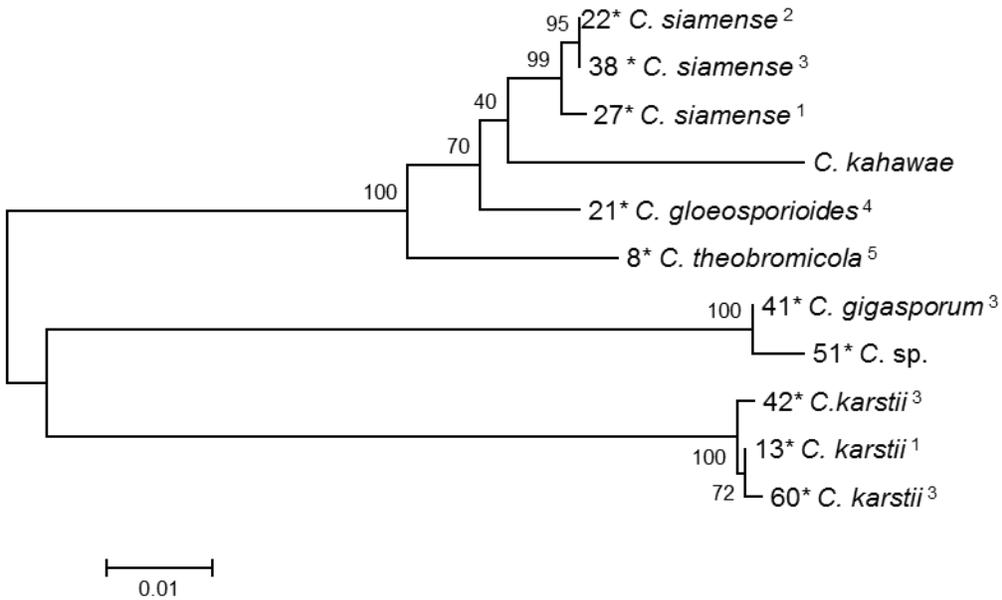


Figura 15. Reconstrucción filogenética de *Colletotrichum* del concadenado de **ACT**, **ITS** y **β -TUB**, con el método de BIC (Bayesian Information Criterion) con modelo T3 (Tamura 3 parámetros) y 500 repeticiones de Bootstrap de las 10 secuencias de este estudio, y tres secuencias concadenadas de *C. kahawae* (números de accesoión en GenBank: JX010234, JX009638, JX010435). Bootstrap 500 réplicas. Árbol construido sin raíz. *Número de aislamiento. ¹En hoja con lesión atípica de *Cercospora*. ²En hoja con lesión típica de *Cercospora*. ³ Fruto verde sintomático. ⁴ Fruto maduro sintomático. ⁵Fruto momificado.

4. Discusión

De los 10 aislamientos seleccionados procedentes de hoja, fruto verde, maduro y necrosado se identificaron morfológica y molecularmente un total de cinco especies pertenecientes a tres complejos: *C. gloeosporioides*, *C. boninense* y *C. gigasporum*.

Las diferencias morfológicas de los aislamientos, como color de colonia, tamaño de conidios, apresorios y formación de setas no fueron suficientes para poder diferenciar a nivel de especie, esto concuerda con lo mencionado por Damm *et al.* (2012b) quien señala que por sí sola la morfología no puede colocar de forma inequívoca un aislado en un complejo, debido a que existen especies morfológicamente similares, como las pertenecientes al complejo *boninense*, que son micro-morfológicamente similares a las del complejo *C. gloeosporioides*, pero genéticamente distintas (Cannon *et al.*, 2012).

En el complejo *C. gloeosporioides* fue donde se ubicó el mayor número de aislamientos, concentrados en tres especies: *C. gloeosporioides*, *C. theobromicola* y *C. siamense*.

Prihastuti *et al.* (2009) reporta a *C. siamense* y *C. gloeosporioides* causando antracnosis en frutos de cafeto. Sin embargo en este estudio *C. siamense* también se aisló de hojas de cafeto y se demostró su patogenicidad en las mismas.

C. theobromicola se aisló únicamente de fruto necrosado. Udayanga *et al.*, (2013) menciona que *C. theobromicola* es una especie comúnmente asociada con frutos tropicales y reportada en *Annona* spp. y *Theobroma cacao* en Panamá y México.

C. karstii fue aislado de frutos verdes y también de hojas. Damm *et al.* (2012a) reporta esta especie en frutos de cafeto en Vietnam.

C. gigasporum fue aislado de fruto verde y de hoja. Rakotonirina *et al.* (2013) reporta a *C. gigasporum* como endófito aislado de café en Colombia y en México se ha encontrado como endófito foliar en *Stylosanthes guianensis* (Rakotoniriana *et al.*, 2012) y asociado a *Musa* sp. (Liu *et al.* 2014). Aunque esta especie se menciona en la literatura como un potencial patógeno en cafetales, en este estudio se demostró su patogenicidad en hojas de Caturra Rojo.

Colletotrichum sp. se caracterizó por presentar conidios de gran tamaño (mayores a 30 μm) por lo que se infiere que pertenece al complejo *C. gigasporum*. Liu *et al.* (2014) menciona que las especies ubicadas en este complejo forman conidios más grandes que la mayoría de especies del género *Colletotrichum*, lo que proporciona un carácter valioso para diagnóstico.

Los mejores marcadores moleculares fueron β - tubulina y Actina, ya que ayudaron a diferenciar las especies de *Colletotrichum*. Cannon *et al.* (2012) menciona que las especies pueden ser identificadas con el uso de otros genes diferentes a ITS, como actina y beta tubulina y la combinación de estos genes.

En este estudio el uso de ITS fue confuso, se alineó con un gran número de especies en el Genbank y no diferencio las especies, lo cual coincide con lo reportado por Cannon *et al.* (2012) quienes mencionan que la separación de especies de *Colletotrichum* basándose en las secuencias de ITS ha resultado insatisfactoria, debido a que el fragmento del gen es demasiado conservado evolutivamente para distinguir entre taxones. ITS es ampliamente utilizado para la diferenciación de las especies en

hongos y recientemente se ha propuesto como un marcador de secuencias para código de barras universal (Schoch *et al.*, 2012). Sin embargo hay evidencia de que secuencias solas de ITS pueden constituir marcadores de código de barras útiles para algunos grupos de Basidiomycota (Kõljalg *et al.*, 2005; Dentinger *et al.*, 2011).

Filogenias multilocus ahora se utilizan normalmente como base principal para describir nuevas especies de *Colletotrichum* (Cannon *et al.*, 2012). En este estudio se pudo comprobar que actina y β -tubulina permiten separar las especies y cuando se utilizan en conjunto el nivel de soporte es mayor por lo que ayuda a identificar de manera confiable las especies de *Colletotrichum*.

Se encontró que las cinco especies y *Colletotrichum* sp. fueron patogénicas en hojas de cafeto de la variedad Caturra Rojo y los síntomas encontrados coincidieron con los encontrados en campo.

No se encontró la especie cuarentenada *C. kahawae* en las muestras analizadas. Sin embargo, esta especie continúa siendo una amenaza para los productores de cafeto en México, por lo que su monitoreo a través de estudios de diagnósticos periódicos son recomendados.

5. Conclusiones

Se identificaron morfológica y por análisis multilocus cinco especies de *Colletotrichum* en cafeto: *C. gigasporum*, *C. gloesporioides*, *C. karstii*, *C. siamense* y *C. theobromicola*; y otra posible especie *C. sp.* perteneciente al complejo *C. gigasporum*.

En las plantaciones de cafeto existe una diversidad de especies de *Colletotrichum* causando antracnosis en hojas y frutos, y necrosis de ramas apicales.

Todas las especies resultaron patogénicas en hojas de cafeto produciendo síntomas a los 14 días después de la inoculación.

6. Referencias

- Cai, L., K.D. Hyde, P.W.J. Taylor, B.S. Weir, J. Waller, M.M. Abang, J.Z. Zhang, Y.L. Yang, S. Phoulivong, Z.Y. Liu, H. Prihastuti, R.G. Shivas, E.H.C. McKenzie, and P.R. Johnston. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39:183-204.
- Cannon, P.F., A.G. Buddie, and P.D Bridge. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104:189-204.
- Cannon, P.F., U. Damm, P.R. Johnston, and B.S. Weir. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*. 73:181-213.
- Carbone, I., and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Castellanos G, C. Jara, y G. Mosquera. 2013. Producción de micelio en medio líquido para extracción de ADN. CIAT. Disponible en: http://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2013/04/guia_practica9.pdf
- CNC. 1955. Comisión Nacional del Café. Manual práctico del cultivo de cafeto en México. México 216 p.
- Crous, P.W., G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, and R.A. Samson. 2009. Fungal Biodiversity. CBS. Laboratory Manual series 1, Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands. 269 p.
- Damm, U., P.F. Cannon, J.H.C. Woudenberg, and P.W. Crous. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73:37-113.
- Damm, U., P.F. Cannon, J.H.C. Woudenberg, P.R. Johnston, and B. Weir. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*. 73:1-36.

- Dentinger, B.T.M., M.Y. Didukh, J.M. Moncalvo. 2011. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). PLoS one 6: (9) 2-8.
- DNASTAR. 2001. Lasergene expert sequence analysis software. User manual. Version 5. DNASTAR Inc Madison, Wisconsin, USA.
- Gardes, M., and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118.
- Glass, N.L., and G. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1323–1330.
- Hyde, K.D., L. Cai, E.H.C. McKenzie, Y.L. Yang, J.Z. Zhang, and H. Prihastuti. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39:1-17.
- Kõljalg, U., K.H. Larsson, K. Abarenkov, R.H. Nilsson, I.J. Alexander, U. Eberhardt, S. Erland, K. Høiland, R. Kjøller, E. Larsson, T. Pennanen, R. Sen, A. F. Taylor, L. Tedersoo, T. Vrålstad, and B.M. Ursing. 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166: 1063-1068.
- Liu, F., L. Cai, P.W. Crous, and U. Damm. 2014. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. *Persoonia* 33: 83–97.
- Liu, F., U. Damm, L. Cai., and P.W. Crous. 2013. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with anthracnose diseases of *Proteaceae*. *Fungal Diversity* 61: 89-105.

- Moriwaki, J., T. Sato, and T. Tsukiboshi. 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience* 44:47-53.
- Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E.H.C. McKenzie, and K.D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39:89-109.
- Rakotoniriana, E.F., J. Scauflaire, C. Rabemanantsoa, S. Urveg-Ratsimamanga, A.M. Corbisier, J. Quetin-Leclercq, S. Declerck, F. Munaut. 2013. *Colletotrichum gigasporum* sp. nov., a new species of *Colletotrichum* producing long straight conidia. *Mycological Progress* 12:403-412.
- Rojas, E.I., S.A. Rehner, G.J. Samuels, S.A. Bael, E. A. Herre, P.F. Cannon, R. Chen, J. Pang, R. Wang, Y.Q. Zhang, and T. Sha. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish pathogen and endophyte clades. *Mycologia* 102:1318-1338.
- Schoch, C.L., K.A Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J.L. Spouge, C.A. Levesque, and W. Chen. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109(16):6241-6246.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*: 30 2725-2729

- Sequencher. 2014. Sequencher software package Versión (5.3). Gene Codes Corp., Ann Arbor, Michigan. EUA.
- Taylor, J.W., D. Jacobson, S. Kroken, T. Kasuga, D.M. Geiser, D. S. Hibbett, and M.S. Fisher. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31:21-32.
- Udayanga, D., D.S. Manamgoda, X. Liu, E. Chukeatirote, and K.D. Hyde. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits?. *Fungal Diversity* 61(1):165-179.
- Weir, B., P.R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73:115-180.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis. M.A, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, (eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications* .Academic Press, San Diego, USA. pp 315–322
- Woudenberg, J.H.C., M.M. Aveskamp, J de. Gruyter, A.G. Spiers, and P.W. Crous. 2009. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia* 22: 56–62.
- Yang, Y., L. Cai, Z. Yu, Z. Liu, and K.D. Hyde. 2011. *Colletotrichum* species on *Orchidaceae* in southwest China. *Cryptogamie, Mycologie* 32(3): 229-253.

Anexo A.

Porcentaje de similitud con secuencias comparadas con el NCBI.

| No. | Deposito colección | Este estudio Especie No. accesión | BLAST: Número de accession NCBI, similitud* y cobertura** (%) | | | | |
|-----|--------------------|---|--|---|--|--|---|
| | | | ACT | TUB2 | CAL | GAPDH | ITS |
| 41 | CP-CC033 | <i>C. gigasporum</i> KT122924 KT122914 KT122934 | <i>C. gigasporum</i> ^h KF687786 100*, 100** | <i>C. gigasporum</i> ^h KF687871 99.6, 99.0 <i>C. sp.</i> ^j = VEGA 508 = <i>C. gigasporum</i> FN599822 99.6*, 98.0** | | | <i>C. gigasporum</i> ^{gg} JN050242 99.6* 100** |
| 21 | CP-CC032 | <i>C. gloeosporioides</i> KT122923 KT122913 KT122943 KT122939 KT122933 | <i>C. gloeosporioides</i> ^{dd} KC566856 100*, 100** | <i>C. gloeosporioides</i> ^b KC293626 100*, 100** | <i>C. gloeosporioides</i> KJ954680 100*, 100** | <i>C. gloeosporioides</i> KM053197 100*, 100** | <i>C. gloeosporioides</i> KP145438 100*, 100** |
| 51 | CP-CC034 | <i>C. sp.</i> KT122925 KT122915 KT122935 | <i>C. gigasporum</i> ^h KF687796 98.8*, 99.0** | <i>C. sp.</i> ^j = VEGA 508 = <i>C. gigasporum</i> FN599822 100, 98.0 <i>Glomerella septospora</i> ^g (<i>C. taiwanense</i>) GU935914 99.4*, 100** <i>C. gigasporum</i> ^h KF687880 99.2*, 99** | | | <i>Glomerella septospora</i> (<i>C. taiwanense</i>) GU935910 100*, 100** <i>C. gigasporum</i> ^{gg} JN050242 99.6*, 100** <i>C. gloeosporioides</i> KM246193 100*, 100** |

| No. | Deposito colección | Este estudio Especie No. accesión | BLAST: Número de accession NCBI, similitud* y cobertura** (%) | | | | |
|-----|--------------------|--|---|---|-----|--|--|
| | | | ACT | TUB2 | CAL | GAPDH | ITS |
| 13 | CP-CC029 | <i>C. karstii</i> KT122920 KT122910 KT122930 | <i>C. karstii</i> ^{bb, cc} KC512184 99.6*, 99.0** | <i>C. karstii</i> ^b KC293653 100*, 100** | | | <i>C. karstii</i> KJ813594 100*, 100** |
| 42 | CP-CC030 | <i>C. karstii</i> KT122921 KT122911 KT122931 | <i>C. karstii</i> ^{bb} KC512184 98.6*, 95.0** <i>C. boninense</i> ⁱ GU935803 96.6*, 99.0** | <i>C. karstii</i> ^b KC293650 100*, 100** <i>C. boninense</i> ⁱ GU935901 99.8*, 100** | | | <i>C. karstii</i> KJ813594 100*, 100** <i>C. boninense</i> , muchos KF819619 100*, 100** <i>C. gloeosporioides</i> , 100*, 100** |
| 60 | CP-CC031 | <i>C. karstii</i> KT122922 KT122912 KT122932 | <i>C. karstii</i> ^{bb} KC512184 99.6*, 99.0** | <i>C. karstii</i> ^b KC293650 100, 100 <i>C. boniensis</i> ⁱ GU935901 99.8*, 100** | | | <i>C. karstii</i> KJ813594 99.8*, 100** <i>C. boniensis</i> KF819619 99.8* 100** |
| 22 | CP-CC035 | <i>C. siamense</i> KT122926 KT122916 KT122940 KT122936 | <i>C. siamense</i> ^{ee} KC676712 99.6*, 100** | <i>C. siamense</i> ^c KC790896 99.8*, 100** <i>C. gloeosporioides</i> ^d HM575217 99.8*, 100** | | <i>C. siamense</i> KM053171 98.5 .99.0*, 100** | <i>C. siamense</i> KP145423 99.1*, 100** <i>C. jasmini-sambac</i> ^c KC790945 syn <i>C. siamense</i> 99.3*, 100** |

| No. | Deposito colección | Este estudio Especie No. accesión | BLAST: Número de accession NCBI, similitud* y cobertura** (%) | | | | |
|-----|--------------------|--|---|---|-----|--|---|
| | | | ACT | TUB2 | CAL | GAPDH | ITS |
| 22 | CP-CC035 | <i>C. siamense</i> | | | | | <i>C. gloeosporioides</i> 22JF441191 99.3, 100, <i>C. spp</i> 99.1*, 100* |
| 27 | CP-CC036 | <i>C. siamense</i> KT122927 KT122917 KT122941 KT122937 | <i>C. siamense</i> ^{aa} KP145311 98.9*, 100** <i>C. gloeosporioides</i> ^{ff} KF712382 98.9*, 100** <i>C. sp.</i> 98.9*, 100** | <i>C. siamense</i> ^e KF897926 99.8*, 100** <i>C. gloeosporioides</i> ^d HM575217 99.8*, 100** | | <i>C. siamense</i> KM053171 100*, 100* | <i>C. siamense</i> KP145423 99.1*, 100** <i>C. jasmini-sambac</i> ^c syn <i>C. siamense</i> KC790945 99.3*, 100* <i>C. gloeosporioides</i> 99.3*, 100** JF441191 <i>C. spp.</i> 99*, 100** |
| 38 | CP-CC037 | <i>C. siamense</i> KT122928 KT122918 KT122942 KT122938 | <i>C. siamense</i> ^{ee} KC676712 99.6*, 100** <i>C. gloeosporioides</i> ^{ff} KF712382 99.6*, 100** <i>C. sp.</i> ^c KC790645 99.6*, 100** | <i>C. siamense</i> ^e KF897926 99.8*, 100** <i>C. gloeosporioides</i> ^d HM575217 100*, 100** <i>C. sp.</i> ^f KC992330 99.8*, 99.0** | | <i>C. siamense</i> KM053171 100, 100 | <i>C. siamense</i> KP145423 99.1*, 100** <i>C. jasmini-sambac</i> ^c syn. <i>C. siamense</i> KC790945 99.3*, 100** |

| No. | Deposito colección | Este estudio Especie No. accesión | BLAST: Número de accession NCBI, similaridad* y cobertura** (%) | | | | |
|-----|--------------------|--|---|--|-----|-------|--|
| | | | ACT | TUB2 | CAL | GAPDH | ITS |
| 38 | CP-CC037 | <i>C. siamense</i> | <i>C. asianum</i> ^{dd} KC566879 99.2*, 99** | | | | <i>C. gloeosporioides</i> JF441191 99.3*, 100** <i>C. spp.</i> 99.1,* 100* |
| 8 | CP-CC028 | <i>Colletotrichum theobromicola</i> KT122919 KT122909 KT122929 | <i>C. theobromicola</i> ^{aa} KC566866 99.6*, 100** | <i>C. theobromicola</i> ^a GU994476 100*, 100** <i>C. grevilleae</i> ^b KC297102 100, 100 | | | <i>C. theobromicola</i> KM505032 100*, 100** |

**LISTA DE PUBLICACIONES INDICADAS EN NCBI DE LAS SECUENCIAS
MENCIONADAS EN ANEXO A.**

- ^a Rojas, E.I., S.A. Rehner, G.J. Samuels, S.A. Bael, E. A. Herre, P.F. Cannon, R. Chen, J. Pang, R. Wang, Y.Q. Zhang, and T. Sha. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panama: multilocus phylogenies distinguish pathogen and endophyte clades. *Mycologia* 102:1318-1338.
- ^b Liu, F., U. Damm, L. Cai, and P.W. Crous. (2013). Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with anthracnose diseases of *Proteaceae*. *Fungal Diversity* 61: 89–105.
- ^c Sharma, G., N. Kumar, B.S.Weir, K.D. Hyde, and B.D. Shenoy. 2013. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Diversity* 61 (1):117-138.
- ^d Chen, G., and H. Li. Species and population diversity of *Colletotrichum* spp. causing citrus anthracnose in China. No publicado.
- ^e Liu,W., N.X. Ye, L.L. Lian, W. Liu, and Y.S. Chen. *Colletotrichum* species on tea plant in Fujian provinces, China. No publicado.
- ^f Vieira, W.A.S., N.B. Lima, M.W. Marques, S.J. Michereff. and M.P.S Camara. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*
- ^g Hong,S.K., W.G. Kim, K.J Choj, H.W. Choj, Y.K. Lee, and S.Y. Lee. Occurrence of Chili Pepper Anthracnose Caused by *Glomerella septospora* in Korea. No publicado

- ^h Liu, F., L. Cai, P.W. Crous, and U. Damm. 2014. The *Colletotrichum gigasporum* species complex. *Persoonia* 33: 83–97.
- ⁱChoi, K. J., W.G. Kim, H.G. Kim, H.W. Choi, Y.K. Lee, B.D. Lee, and S.K. Hong. 2011. Morphology, molecular phylogeny and pathogenicity of *Colletotrichum panacicola* causing anthracnose of Korean ginseng. *Plant Pathology* 27: 1-7.
- ^j Rakotoniriana, E.F., J. Scauflaire, C. Rabemanantsoa, S. Urveg-Ratsimamanga, A.M. Corbisier, J. Quetin-Leclercq, S. Declerck, F. Munaut. 2013. *Colletotrichum gigasporum* sp. nov., a new species of *Colletotrichum* producing long straight conidia. *Mycological Progress* 12:403-412
- ^{aa} Weir, B., P.R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73:115-180.
- ^{bb} Alvarez, E., L. Ganán, A. Rojas-Trivino, J.F. Mejía, G.A. Llano, and A. González. 2014. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *European Journal of Plant Pathology*. 139 (2):319-332.
- ^{cc} Damm, U., P.F. Cannon, J.H.C. Woudenberg, P.R. Johnston, and B. Weir. 2012. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*. 73:1-36.
- ^{dd} Braganca, C.A.D. Species in the *Colletotrichum gloeosporioides* complex on fruits in Brazil. No publicado.
- ^{ee} Manamgoda, D.S., D. Udayanga, L. Cai, E. Chukeatirote, and K.D Hyde. Endophytic. 2013. *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Diversity* 61(1):107-115.

- ^{ff} Ma, W.J., X. Yang, X.R Wang, Y.S. Zeng, M.D. Liao, C.J. Chen, S. Sun, and D.M Ji. 2014. First Report of Anthracnose Disease on Young Stems of Bawanghua (*Hylocereus undatus*) Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in China. *Plant Disease*. 98 (7), 991.
- ^{gg} Noireung, P., S. Phoulivong, F. Liu, L. Cai, E.H.C. Mckenzie, E. Chukeatirote, E.B.G. Jones, A.H. Bahkali, K.D. Hyde, and A. Bahkali. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. *Cryptogamie Mycologie* 33(3): 347-362.