



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

**INFECCIÓN CRUZADA DE ESPECIES DE *Colletotrichum* EN FRUTOS
TROPICALES EN POSTCOSECHA**

LUIS ALFONSO AGUILAR PÉREZ

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO
2010**

LA PRESENTE TESIS TITULADA "INFECCION CRUZADA DE ESPECIES DE *Colletotrichum* EN FRUTOS TROPICALES EN POSTCOSECHA" REALIZADA POR EL ALUMNO LUIS ALFONSO AGUILAR PEREZ BAJO DIRECCION DEL CONSEJO PARTICULAR INDICADO, HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. DANIEL NIETO ANGEL

ASESOR:


Dr. JOSE SERGIO SANDOVAL ISLAS

ASESOR:


DR. MARIO OROZCO SANTOS

Montecillos, Texcoco, México Diciembre de 2010

DEDICATORIAS

Con todo mi amor a mi esposa María Dolores Sánchez Aquirre por toda su comprensión, cariño, felicidad y apoyo en mis momentos más difíciles, por ser quien constantemente me ha apoyado y me da voz de aliento para salir adelante en cada uno de mis tropiezos

A mi hijo Luisito por ser el motivo de mi energía, alegría y éxitos en la vida.

A mi madre, por ser mi principal ejemplo de vida a quien le debo absolutamente todo lo que tengo y todo lo que soy.

A todos mis hermanos por el cariño y amistad que siempre nos ha unido

A mi padre por haberme dado la vida

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** Todo Poderoso por quien todo fue hecho y porque nos da la oportunidad y la capacidad de conocer un poquito de su inmensa sabiduría.

Al pueblo de México, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por haberme apoyado en la realización de mis estudios de Maestría dándome la oportunidad de alcanzar una más de mis metas.

Al **Dr. Daniel Nieto Angel**, quién como maestro y amigo, representó un gran apoyo durante mi formación académica, así como en la realización de la presente investigación

Agradezco a **Dr. Francisco Marcelo Lara Viveros** su apoyo incondicional en la realización de esta tesis.

Al **Dr. Sergio Sandoval Islas** por el apoyo brindado a esta investigación

Al **Dr. Mario Orozco Santos** por sus valiosas sugerencias para mejor este trabajo

Agradezco a mis “**amigos**”, por su apoyo en todos los momentos difíciles y por haber compartido grandes momentos de aprendizaje, discusión, paciencia y distracción, así como la gran amistad que encontré en ellos.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma hicieron aportaciones valiosas tanto en mi formación como en mi trabajo de investigación.

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. CAPITULO I. Revision de Literatura..... | 1 |
| 1.1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.2. <i>Colletotrichum</i> spp..... | 4 |
| 1.2.1. Importancia y generalidades | 4 |
| 1.2.2. Taxonomía | 6 |
| 1.2.3. Morfología | 6 |
| 1.2.4. Patogénesis..... | 7 |
| 1.2.5. Rangos de hospedantes y sintomatología..... | 9 |
| 1.2.6. LITERATURA CITADA..... | 14 |
| 2 CAPITULO II. INFECCION CRUZADA DE ESPECIES DE <i>Colletotrichum</i> EN FRUTOS TROPICALES EN POSTCOSECHA | 21 |
| 2.1. RESUMEN | 21 |
| 2.2. INTRODUCCION | 22 |
| 2.3. MATERIALES Y METODOS | 24 |
| 2.3.1. Aislamiento del hongo y obtención de cultivos monospóricos..... | 24 |
| 2.4. Pruebas de patogenicidad..... | 26 |
| 2.5. Identificación morfológica de los aislamientos..... | 26 |
| 2.5.1. Color de la colonia..... | 27 |
| 2.5.2. Tipo de micelio | 27 |
| 2.5.3. Crecimiento micelial a través del tiempo | 27 |
| 2.5.4. Forma y tamaño de conidios | 28 |
| 2.5.5. Características de los apresorios | 29 |
| 2.6. Identificación molecular | 31 |
| 2.6.1. Extracción de ADN | 31 |
| 2.6.2. Amplificación del ADN mediante PCR..... | 32 |
| 2.7. Pruebas de patogenicidad cruzada | 32 |
| 2.8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 34 |
| 2.8.1. Pruebas de patogenicidad..... | 34 |
| 2.8.2. Identificación morfológica de los aislamientos..... | 35 |
| 2.8.2.1. Crecimiento micelial | 36 |
| 2.8.3. Identificación molecular | 38 |
| 2.8.4. Patogenicidad cruzada | 38 |
| 2.8.5. CONCLUSIONES..... | 42 |
| 2.8.6. LITERATURA CITADA..... | 44 |
| 3. CAPITULO III. EFECTIVIDAD BIOLOGICA DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL <i>IN VITRO</i> DE <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz | 56 |
| 3.1. RESUMEN | 56 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. INTRODUCCIÓN | 57 |
| 3.3. MATERIALES Y MÉTODOS | 58 |
| 3.3.1. Aislamiento del hongo y pruebas de patogenicidad | 58 |
| 3.3.2. Identificación morfológica y molecular | 59 |
| 3.3.3. Obtención de extractos vegetales | 60 |
| 3.3.4. Efectividad biológica de los extractos <i>in vitro</i> | 61 |
| 3.3.5. Determinación de la Concentración Letal Media (CL50 | 63 |
| 3.6. RESULTADOS Y DISCUSION | 63 |
| 3.6.1. Pruebas de patogenicidad..... | 63 |
| 3.6.2. Identificación del agente causal de la antracnosis | 64 |
| 3.6.3. Efectividad biológica de los extractos <i>in vitro</i> | 64 |
| 3.6.4. Determinación de la Concentración Letal Media (CL50 | 68 |
| 3.6.4.1. Extracto crudo de Ajo | 68 |
| 3.6.4.2. Extracto crudo de Zacate limón | 69 |
| 3.7. CONCLUSIONES..... | 72 |
| 3.8. LITERATURA CITADA..... | 73 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Aislamientos de <i>Colletotrichum</i> obtenidos de diferentes frutos y procedencias | 24 |
| Cuadro 2. Área bajo la curva del diámetro de la lesión provocado por diferentes aislamientos de <i>Colletotrichum</i> sp. inoculados en diferentes frutos. | 40 |
| Cuadro 3. Diámetro de la lesión en mm en el día siete de evaluación provocado por diferentes aislamientos de <i>Colletotrichum</i> sp. inoculado en diferentes frutos | 41 |
| Cuadro 4. Tratamientos, resultado de las proporciones de metanol:agua para cada especie vegetal. | 61 |
| Cuadro 5. Determinación de los costos para preparar 100 ml de extracto crudo..... | 66 |
| Cuadro 6. Efecto de los extractos vegetales de diferentes especies y con diversas combinaciones de metanol y agua, sobre el crecimiento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> †Letras iguales no indican diferencias significativas. Tukey (P=0.05%) | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS.

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Medición de conidios con el programa Dino Lite P/N:AM423X. | 29 |
| Figura 2. Inducción de apresorios en cámara húmeda. | 30 |
| Figura 3. Apresorios de <i>Colletotrichum</i> | 30 |
| Figura 4. Síntomas de antracnosis en todos los frutos inoculados..... | 34 |
| Figura 5. Características de las colonias desarrolladas en PDA de los aislamientos <i>Colletotrichum</i> | 36 |
| Figura 6. Área bajo la curva acumulada del crecimiento micelial de ocho aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. obtenido de diferentes frutos | 37 |
| Figura 7. Modelo de regresión para determinar la DL ₅₀ de extracto acuoso de diente de ajo. | 68 |
| Figura 8. Evaluación de extracto acuoso de diente de ajo al 1%, 5% 10% y 15%..... | 69 |
| Figura 9. Modelo de regresión para determinar la DL ₅₀ de extracto de hojas de té limón en una proporción metanol agua 70:30 v/v. | 70 |
| Figura 10. Evaluación de extracto de zacate limón al 1%, 5% 10% y 15%..... | 71 |

1. CAPITULO I.

REVISION DE LITERATURA

1.1. INTRODUCCIÓN

El hongo del género *Colletotrichum*, es un patógeno de distribución cosmopolita y con predominancia en los trópicos y subtrópicos (Xiao *et al*; 2004). Infechan a un amplio rango de hospedantes y aún se conoce poco de las relaciones genéticas dentro de las especies (Manners *et al*; 1993). Agrios, (2005) menciona que hay una variación considerable respecto a los tipos de plantas hospedantes a los que cada especie de *Colletotrichum* puede atacar, incluso puede haber varias razas con un grado de patogenicidad distinto dentro de cada una de las especies del hongo, sin embargo Sutton, (1992) lo considera un patógeno con una alta variabilidad genética.

Este hongo es el causante de un grupo de enfermedades conocidas como antracnosis, las cuales pueden manifestarse tanto en precosecha como en postcosecha (Yakoby *et al*; 2001). Sin embargo se agrupa entre los patógenos más importantes en postcosecha (Bailey and Jeger 1992; Stanley *et al*; 1998; Abang, 2003), debido a la capacidad que tiene de provocar infecciones latentes en frutos en desarrollo, las cuales se presentan una vez que estos llegan a su madurez de consumo y se manifiestan con la presencia de manchas circulares café oscuras en el pericarpio y daños por ablandamiento (Prusky *et al.*, 2001; Yakoby *et al.*, 2000).

La antracnosis afecta cereales, leguminosas, pastos y cultivos perennes, incluyendo árboles frutales. Entre los frutales más afectados por la antracnosis, se destacan el mango (*Mangifera indica* L.), el aguacate (*Persea americana* Mill.), el tomate de árbol

(*Cyphomandra betacea* Cav.), la papaya (*Carica papaya* L.), la mora (*Rubus glaucus* Benth), el lulo (*Solanum quitoense* Lam.), la guanábana (*Annona muricata* L.), la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), la sandía (*Citrullus lanatus* Thunb.), el melón (*Cucumis melo* L.), el plátano (*Musa* spp.), la guayaba (*Psidium guajava* L.), el maracuyá (*Passiflora edulis* Sims) y los cítricos (*Citrus* spp) y el café (*Coffea arabica* L.) (Lenné 1992; Nicholson, 1992; Dodd *et al*; 1992; Owolade *et al*; 2005; Abang, 2003; García *et al*; 2000; Davis *et al*; 1994).

En la actualidad se aceptan 39 especies de *Colletotrichum* descritas en el trabajo de Sutton (1992). Su descripción está basada en las características culturales de la colonia en medio de cultivo, tamaño y forma de los conidios y apresorios, presencia o ausencia de setas y su teleomorfo (Freeman *et al*; 1998; Lardner *et al*; 1999). Sin embargo la considerable variación patogénica y morfológica que presenta este hongo ha ocasionado dificultades para su clasificación al usar únicamente caracteres morfológicos (Johnston y Jones, 1997; Sutton, 1980).

La alta diversidad en el amplio grupo de especies del género *Colletotrichum* ha sido muy problemática, ya que el diagnóstico fitopatológico requiere identificar con precisión patógenos específicos para el control de enfermedades. Esta confusión taxonómica ha provocado el aumento en el uso de herramientas moleculares para la identificación de diversidad interespecífica e intraespecífica dentro de un grupo complejo de especies (Guerber *et al*; 2003).

En la actualidad, el uso de la tecnología basada en el ADN ha permitido contar con nuevas herramientas para la investigación de la variación genética y de los genes que controlan la patogenicidad y especificidad en hongos fitopatógenos (Martin *et al*; 2000). Existen diferentes métodos para detectar polimorfismos una de las técnicas muy utilizada es la amplificación de regiones no conservadas del ADN, ya sean ribosomales (ITS) o intergénicas (IGS) (Förster y Adaskaveg, 2000). Estas técnicas trabajan con ADN extraído directamente del individuo en grandes cantidades o con fragmentos de ese ADN amplificado mediante la técnica de PCR (Martin *et al.*, 2000). Aunque las regiones ITSs representan solo una parte del genoma, éstas son suficientemente variables para facilitar la separación a nivel de género y son frecuentemente útiles a nivel de especies en los ascomicetes (White *et al*; 1990).

Este hongo se caracteriza por presentar una amplia gama de hospedantes (Peres *et al*; 2005). El potencial de infección cruzada ha sido reportado entre diferentes especies de y genotipos de *C. gloeosporioides* sobre una gran variedad de frutas tropicales, subtropicales y templadas bajo condiciones artificiales de inoculación (Bernstein *et al*; 1995), este mismo autor ha demostrado que aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* son capaces de infectar manzana, nuez y durazno. Por otro lado Freeman y Shabi (1996) mostraron que *C. gloeosporioides* aislado de almendro, manzana, aguacate y mango, así como asilamientos de *C. acutatum* aislado de anémona, manzana y durazno, infectan frutos de otros hospederos como manzano, aguacate, almendro, mango y nectarina, esto demuestra el potencial de infección cruzada entre diferentes especies del hongo, lo cual puede implicar un riesgo fitosanitario grave debido a la gran diversidad de cultivos tropicales que existen en

México y a los diferentes sistemas de producción en los que los cuales se producen dos cultivos en el mismo predio, en estos sistemas se puede presentar el fenómeno de infección cruzada, debido a que cepas de *Colletotrichum* que son patogénicas para un cultivo pueden encontrar un hospedero alternativo en el cultivo asociado, trayendo como consecuencia una mayor dispersión de la enfermedad y un incremento en los costos asociados al control. Por tal razón los objetivos del presente trabajo fueron determinar la capacidad que tienen cepas de *Colletotrichum* aisladas de un fruto específico, para infectar a otros frutos sanos de diferentes especies.

1.2. *Colletotrichum* spp.

1.2.1. Importancia y generalidades

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

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

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

El género *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. & Sacc.) fue descrito en el año 1884 y es una especie de amplia distribución en todo el mundo especialmente en zonas tropicales y subtropicales. Von Arx (1957) cito más de 600 sinónimos con otras especies de *Colletotrichum* Corda y *Gloeosporium* Desm. & Mont.; lo cual indica la gran diversidad del genero (Sutton, 1992).

Jeffries *et al;* (1990), distinguieron varias formas patogénicas basadas en los hospederos específicos y características culturales, por otra parte Mas (1983), utilizo el criterio de patogenicidad para diferenciar aislamientos de *C. gloeosporioides*, *C. fragarie*, *C. coccodes*, *C. trifolii*, *C. dematium*, *Glomerella cingulata* y *Gloeosporium* spp. y observo que la patogenicidad vario con el aislamiento y el tejido inoculado.

Entre las especies más agresivas pertenecientes a este género, (Bailey and Jeger, 1992) se pueden destacar a *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. *in* Penz. (teleomorfo: *Glomerella cingulata* [Stoneman] Spauld. & H. Schrenk) este es un patógeno de una amplia variedad de frutas, tales como manzanas, aguacates, cítricos, papayas, melocotones, mangos y fresas, *C. acutatum* patógeno de almendras, aguacates, mangos, melocotones, cítricos, uvas y fresas, *C. coccodes* este hongo ataca principalmente a pimientos, patatas y tomates, *Colletotrichum kahawae* es el agente causal de la denominada enfermedad de la cereza del café es morfológicamente similar a *C. gloeosporioides* pero se ha diferenciado por su capacidad de infectar cerezas de café verde (Waller *et al;* 1993), *Colletotrichum musae* es el agente causal de la antracnosis de los bananos y plátanos, así como otras especies con múltiples

huéspedes como son *C. lindemuthianum*, *C. capsici*, *C. dematium*, *C. graminicola* y *C. truncatum*.

1.2.2. Taxonomía

Colletotrichum spp, (estado anamórfo) de *Glomerella* spp, (estado teleomorfo), pertenece al reino Fungi; phylum Ascomycota; clase Sordariomycetes; subclase Sordariomycetes incertae sedis; orden Phyllachorales; familia Phyllachoraceae; género *Glomerella*; especie *Glomerella* (Stoneman) Spauld y H. Schrenk. (fase teleomórfica, sexual o perfecta) o *Colletotrichum gloeosporioides* (fase anamórfica, asexual o imperfecta) (Villanueva, 2004).

1.2.3. Morfología

Colletotrichum presenta un micelio enramado inmerso, septado que toma coloración hialina hasta castaño pálido los acérvulos, separados o confluentes en forma de disco o de cojín, ceroso, subepidermal, epidermal y subcuticular típicamente con setas o espinas negras en los bordes o entre los conidióforos, formado de pseudoparénquima con paredes delgadas o gruesas; conidióforos simples, elongados; conidias hialinas, ovoides u oblongadas (Barnett and Hunter, 1998; Holliday, 1995; Reyes, 2008).

Las setas presentes o ausentes, originadas irregularmente desde el pseudoparénquima, más o menos fuertes, no ramificadas, con un ápice agudo u obtuso, suaves y con una pared gruesa septada en algunos casos. Los conidióforos septados, ramificados sobre la base de color castaño claro o hialina, formados de la parte superior de las células del pseudoparénquima son simples, cortos, erectos. Las

conidios también son hialinos, aceptadas de forma cilíndrica, fusiforme, de una sola célula, que durante la germinación se torna de color castaño pálido, se septan y forman el apresorio. A menudo las esporas son tan numerosas que pueden formar masas brillantes de color rosado (Blanchard *et al*, 1992; Holliday, 1995).

1.2.4. Patogénesis

En *Colletotrichum* el proceso de colonización es similar en muchas de sus especies, la penetración al tejido del hospedero implica la formación de una estructura de infección especializada llamada apresorio (Guarro, 1998).

En la patogénesis estructural inducida por diferentes especies de *Colletotrichum* se pueden distinguir tres fases: preinfección, infección e invasión del tejido del hospedante.

En la preinfección el propagulo llega y establece un contacto con la superficie del hospedante (Villanueva, 2004) donde el apresorio que corresponde a una estructura plana, como un bulbo, que se forma cuando la hifa establece el contacto con la superficie e incrementa su diámetro, aumentando la zona de unión entre los dos organismos, lo cual permite que el patógeno se una con mayor firmeza a la planta (Cano *et al*; 2004). El proceso de infección el apresorio penetra al tejido del hospedero y a la pared celular de la epidermis de manera directa (Guarro, 1998; Villanueva, 2004). Durante el proceso de invasión, una vez que ha penetrado el hongo, la hifa crece y coloniza con gran rapidez, inter e intracelularmente, el tejido del hospedante, pero produce poco o ningún oscurecimiento visible u otros síntomas de alteración en tejidos internos (Bailey *et al.*, 1992; Agrios, 2005).

Por otra parte Jeffries *et al*; (1990); Bergstrom and Nicholson, (1999); Perfect *et al* ; (1999); O'Connell *et al*; (2004); Prusky and Dickman, (2000) mencionan que los procesos típicos de infección de las especies de *Colletotrichum* involucran una secuencia común de eventos, entre los que se pueden mencionar: El arribo del conidio a la superficie de la planta., adhesión a la superficie., germinación del conidio., producción de un apresorio., penetración de la epidermis de la planta., Crecimiento y colonización., producción de acervulos y esporulación.

Rodríguez (2007) menciona que posterior a la penetración del hongo, ocurren diferentes estrategias de colonización del tejido que son:

Penetración intracelular hemibiotrofica: Se establece una infección a través de una breve fase biotrofica, asociada con una gran hifa primaria intracelular, convirtiéndose después en una fase necrotrofica destructiva asociada con una hifa secundaria angosta, la cual se ramifica a través del tejido del hospedante.

Penetración necrotrofica intramural, subcuticular: una vez penetrada la cutícula, el patógeno no entra inmediatamente dentro del lumen celular, sino que se desarrolla debajo de la cutícula, entre la pared periclinal y anticlinal de las células epidermales.

En general, las lesiones producidas por este hongo (la antracnosis) se manifiesta por la aparición de manchas con tonalidades negras o marrones; en otras ocasiones, las infecciones aparecen con coloraciones que van del rojo ladrillo al púrpura, y posteriormente cambian hacia coloraciones pardas oscuras, hasta adquirir tonalidades

muy negras, con formas redondeadas u ovaladas, con tamaños variables que pueden oscilar entre un diámetro de 1 ó 2 mm hasta 5 cm. El nombre de antracnosis hace alusión al aspecto visual de las manchas (Agrios, 2005).

1.2.5. Rangos de hospedantes y sintomatología

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

La antracnosis producida por el hongo *Colletotrichum*, es reconocida como la enfermedad más importante. Su presencia se caracteriza por la aparición de manchas oscuras en las hojas, flores y pedúnculos. Adicionalmente, los frutos pueden ser afectados, particularmente en la etapa de cuajado, pudiendo sufrir daños en los frutos llegando a la madurez. La incidencia en los frutos maduros dificulta su comercialización (Hernández, 2006), este hongo puede atacar a diversos tejidos de las plantas, dependiendo la especie de *Colletotrichum* y el hospedante.

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

En el caso de almendra y otras frutas de hoja pueden ser afectados por *C. acutatum*, y *C. gloeosporioides*. Los cítricos pueden verse afectados distintas enfermedades de *Colletotrichum*:

- Caída de frutos y la Antracnosis de limón ambas causadas por *C. acutatum*.
- La muerte de brotes y hojas causada por *C. gloeosporioides*.

Existen diferentes hospedantes que son atacados por diferentes especies de *Colletotrichum* como son: café, cucurbitáceas, pimiento y tomate (Freeman *et al*; 1998).

En maíz, la antracnosis es una enfermedad de importancia mundial, causada por *C. graminicola* que puede infectar todas las partes de la planta y provocar síntomas en cualquier momento del ciclo de vida del cultivo (Bergstrom and Nicholson, 1999).

Las formas más comunes de antracnosis en maíz son el tizón foliar y pudrición del tallo. Los síntomas consisten en lesiones ovales y con frecuencia presentan anillos concéntricos. En plantas adultas, aparecen lesiones individuales rodeadas por un halo amarillento, las cuales llegan a coalescer y forman grandes extensiones de tejido necrosado. Las hojas senescentes son más susceptibles a la enfermedad. La presencia de acérvulos en las lesiones es un signo característico de la enfermedad (Bergstrom y Nicholson, 1999). El síntoma predominante de la antracnosis en tallo es una decoloración de la corteza, llegando a desarrollar lesiones de color negro. En tallos verdes, el hongo ocasiona diferentes síntomas: 1) infecciones sistémicas a través de heridas, en donde la corteza permanece de color verde y parece sana, mientras que el

tejido interno está dañado. 2) infecciones en la corteza del tallo con decoloraciones, pero sin registrar una evidente infección sistémica (Bergstrom y Nicholson, 1999).

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

Otras especies de *Colletotrichum* afectan leguminosas forrajeras: *C. trifolii* en trébol rojo y cultivos forrajeros del género *Medicago* y *Trifolium*; *C. gloeosporioides* sobre lupino y otros forrajes; *C. truncatum* es común en algunas leguminosas forrajeras, pero generalmente es menos dañino que *C. gloeosporioides* (Lenné, 1992).

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

maduras son de color café oscuro a negro. Los frutos enfermos maduran más rápidamente que los frutos sanos (Jones y Slabaugh, 1994).

Colletotrichum kahawae es el agente causal de la denominada enfermedad de la cereza del café en África (Jeffries *et al*; 1990). *C. kahawae* es morfológicamente similar a *C. gloeosporioides* pero se ha diferenciado por su capacidad de infectar cerezas de café verde, *C. kahawae* coloniza la parte externa de la corteza madura de las ramas de café, constituyendo la fuente de inóculo primario para flores y frutos; su importancia radica en que una vez coloniza los frutos, sobre éstos se produce abundante inóculo el cual afecta nuevos frutos. El inóculo producido en las ramas es de menor importancia comparado con el de los frutos por la capacidad para producir mayor cantidad de conidias. (Rodríguez, 2007).

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

En el campo, el hongo puede permanecer en ausencia de sus huéspedes sobreviviendo como saprofito en los restos de las cosechas. Su actividad como patógeno se reinicia con el establecimiento de los nuevos cultivos, atacando a las plántulas poco después de su germinación (Femenia, 2007).

En general, *Colletotrichum* puede atacar todas las partes de las plantas. Las más afectadas son las aéreas (tallos, brotes tiernos, inflorescencias, frutos en formación y en estados avanzados de desarrollo), pero también se han observado ataques en los cuellos de los tallos y en las raíces, aunque son poco frecuentes en algunas especies vegetales (Frederiksen, 1984). La enfermedad se presenta en todos los estados de crecimiento, desde la germinación de las semillas hasta las plantas adultas, y abarca especies perennes y anuales de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Waller, 1992; Lenné 1992; Tarr; 1962, Agrios, 2005).

1.2.6. LITERATURA CITADA

- Abang M M (2003)** Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Causing anthracnose disease of yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Bibliotheca Mycologica*. v. 197.
- Agrios G N (2005)** *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier academic press pp:922
- Bailey J A, M J Jeger (1992)** *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB Berlin, Stuttgart: J. Cramer in der Gebr. Borntraeger Science Publishers. pp:139.
- Barnett H L, B B Hunter (1998)** *Illustrated genera of imperfect fungi*. Cuarta edición. Minnesota. APS Press.218 p.
- Bergstrom G C, R L Nicholson (1999)** The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease* 83:596-608.
- Bernstei B, E I Zehr, R A Dean, E Shabi (1995)** Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Dis.* 79:478-482.
- Blanchard G, C L Campbell, L T Lucas (1992)** *Introduction to Plant Diseases: Identification and Management*. Norwell, Massachusetts. Kluwer Academic Publishers. Second edition 364p.
- Cano J, J Guarro, J Gené (2004)** Molecular and Morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology* 42:2450-2454.
- Correa G, L Lavalett, M P Galindo, L Afanador (2007)** Use of multivariate methods for grouping strains of *colletotrichum* spp. Based on Cultural and morphological characters. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*.60 (1):3671-3690.

- Davis R D, S Chakraborty, D F Cameron, JA G Irwin, R M Boland (1994)** The influence of mixtures of *Stylosanthes* spp. accessions on the occurrence of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Australian Journal of Agricultural Research*. 45:203–210.
- Dodd J C, A Estrada, M J Jeger (1992)** Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics. *In: Colletotrichum: biology pathology and control*. J A Bailey, M J Jeger, (eds). Wallingford, U.K.: CAB International pp:308- 325.
- Femenia R M E (2007)** Caracterización Química de cepas de hongos del género de *Colletotrichum*: Síntesis de Gloeosporiol. Diseño y síntesis de modelos de agentes fungicidas. Tesis de Doctorado en ciencias. Universidad de Cádiz. Puerto Real. 346p.
- Förster H, J E Adaskaveg (2000)** Early brown rot infection in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* 90:171-178.
- Frederiksen R A (1984)** Anthracnose stalk rot. pp. 34-42. *In Sorghum root and stalk rots, a critical review*. Proceedings of the Consultative Group Discussion on Research Needs and Strategies for Control of Sorghum Root and Stalk Rot Diseases. Bellagio, Italy. ICRISA.
- Freeman S, T Katan, E Shabi (1998)** Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-605.
- Freeman S, E Shabi (1996)** Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various host. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49:395-404.

- García M J A, M B Soares, I Grondona, E Monte, A G Buddie, P D Bridge, P F Cannon, (2000)** A physiological and biochemical approach to the systematics of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*.92:488-498.
- Guarro J, T E Svidzinski, L Zaror, M H Forjaz, J Gené, O Fischman (1998)** Subcutaneous Hyalohyphomycosis Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Clinical Microbiology*. 36:3060-3065.
- Guerber J C, B Liu, J C Correl (2003)** Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95:872–895.
- Hernandez C A C (2006)** Caracterizacion y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Mangifera indica* L) y tallos de mora (*Rubus glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. Tesis para obtener el grado en Microbiologo Agrícola y Veterinario, Facultad de ciencias básicas Bogota. 115p
- Holliday P (1995)** Fungus diseases of tropical crops. Dover Publication, Inc. New York. 624p.
- Howard C M, J L Maas, C K Chandler, E E Albregts (1992)** Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease* 76:976-981.
- Jeffries P, J C Dodd, M J Jeger, R A Plumbley (1990)** The biology of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*. 39:343-366
- Johnston P R, D Jones (1997)** Relationships among *Colletotrichum* species from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89:420-430.

- Jones y Slabaugh (1994)** Effect of foliar infectio caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russet Burbank potato. pp 11. *In* Patogenicidad, Variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en Mexico. Tesis de Doctorado para obtener el grado en Biotecnología Microbiana, Facultad de ciencias Biologicas y Agropecuarias, Colima. 105p.
- Lardner R, P R Johnston, K M Plummer, M N Pearson (1999)** Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. *Mycological Research* 103(3):275-285.
- Lenné (1992)** *Colletotrichum* diseases of legumes. *In: Colletotrichum: biology pathology and control.* J A Baily, M J Jeger (eds). Wallingford, U.K.: CAB International. pp:134-166
- Manners J M, A Masel, J A G Irwin (1993)** Molecular genetics of *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes*. *In: Aspects of tropical mycology* S Isaac, J C Frankland, R Watling, A J S Whalley. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. pp: 233-249.
- Martin R R, D James, C A Levesque (2000)** Impacts of molecular diagnostic technologies of plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 207-239
- Mass J L (1983)** Anthracnose of strawberry fruit in Maryland. *Plant Disease Reporter.* 62:488-492.
- Nicholson R L (1992)** *Colletotrichum graminicola* and the Anthracnose disease of maize and sorghum. *In: Colletotrichum: biology pathology and control.* J A Baily, M J Jeger (eds). Wallingford, U.K.: CAB International pp:186- 202.

- O'Connell R, C Herbert, S Sreenivasaprasad, M Khatib, M T Esquerré-Tugayé, B Dumas (2004)** A novel Arabidopsis-Colletotrichum pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:272-282.
- Orozco S M (2006)** Patogenicidad, Variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en Mexico. Tesis de Doctorado para obtener el grado en Biotecnología Microbiana, Facultad de ciencias Biologicas y Agropecuarias, Colima. 105p.
- Owolade O F, A G O Dixon, A A Adeoti, S O Osunlaja (2005)** Sources of resistance to Cassava anthracnose disease. En: *African Journal of Biothechnology*. 4:570-572.
- Peres N A, L W Timmer, J E Adaskaveg, J C Correll (2005)** Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89:784-796.
- Prusky D S, M B Dickman (2000)** *Colletotrichum* Host specificity, pathogenicity, and host-pathogen interactions. The American Phytopathological Society. St Paul Minnesota. 392p
- Prusky D, J McEvoy, R Leverentz, W Conway (2001)** Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology* 9:1105-1113.
- Perfect S E, H B Hughes, O R O'Connell, J R Green (1999)** *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198.

- Reyes D A O (2008)** Caracterización patológica de cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz). Penz & Sacc. En plantas de mango (*Mangifera indica* L.) y papaya (*Carica papaya* L.) y servicios realizados en la estación ICTA-CISUR, CUYUCA, ESCUINTLA. Tesis de Grado de Académico de Licenciado. Guatemala, 141p.
- Rodríguez G A F (2007)** Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Tesis para obtener el título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá. 126p
- Stanley F, K Talma, S Ezra (1998)** Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Disease of Various Fruits. *Plant Disease* 82:596-605.
- Sutton B C (1992)** The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds.). CAB International. Wallingford, U.K. pp:1-26
- Tarr A J (1962)** Diseases of sorghum, Sudan grass and Broomcorn. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 380 pp.
- Villanueva R A (2004)** Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum* spp. e histopatología de la antracnosis causada por *C. fragariae* en frutos de chirimoya (*Annona cherimola* mill.) tesis para obtener el grado de doctorado. colegio de postgraduados. México. 98p
- Von Arx J (1957)** Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. *Phytopath. Zeitschrift*. 29:413-468.

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

White T J, T Bruns, S Lee, J W Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols: A guide to methods and applications*. M A Innis, D H Gelfand, J Sninsky, J T White (eds) Academic Press. New York. pp:315-322.

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

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

Yakoby N, I Kobiler, A Dinoor, D Prusky (2000) pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. Applied and Environmental Microbiology 66:1026-1030.

2. CAPITULO II.

INFECCION CRUZADA DE ESPECIES DE *Colletotrichum* EN FRUTOS TROPICALES EN POSTCOSECHA

2.1. RESUMEN

El género *Colletotrichum* es considerado uno de los principales hongos patógenos de plantas, este hongo se encuentra distribuido a escala mundial y afecta a diferentes cultivos tanto en pre y postcosecha. En el presente trabajo se aislaron e identificaron morfológicamente y molecularmente ocho aislamientos de *Colletotrichum* sp, de banano, papaya, carambolo, chile manzano, aguacate, mango ataulfo y mango manila, estos se inocularon sobre cada uno de los frutos para evaluar el fenómeno de infección cruzada. Se midió diariamente el diámetro de la lesión por siete días. Los resultados mostraron que algunos aislamientos de *C. gloeosporioides* son más agresivos cuando se inoculan sobre su hospedero original, sin embargo ocasionan daños en menor grado en hospederos alternos, y otros aislamientos de esta misma especie presentan mayor agresividad cuando son inoculados en hospederos alternos que sobre su hospedante original. Por otra parte, algunas especies como *C. musae* presentan un menor número de hospedantes. Los frutos de carambolo presentaron resistencia a diferentes aislamientos de *C. gloeosporioides* y *C. musae*. Los frutos que mayor susceptibilidad presentaron fueron banano y papaya, ya que fueron afectados por todos los aislamientos.

Palabras clave: *Colletotrichum*, frutos tropicales, identificación molecular, infección cruzada

2.2. INTRODUCCIÓN

El género *Colletotrichum* es considerado uno de los principales hongos patógenos de plantas y se encuentra distribuido a escala mundial en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo (Wharton y Diéguez, 2004; Peres *et al.* 2005).

Este género es el causante de un grupo de enfermedades conocidas como antracnosis, las cuales pueden manifestarse tanto en precosecha como en postcosecha (Waller, 1992), se agrupa entre los patógenos más importantes en postcosecha (Bailey and Jeger 1992, Stanley *et al.*, 1998, Abang, 2003), debido a la capacidad que tiene de provocar infecciones latentes en frutos en desarrollo y éstas se presentan una vez que estos llegan a su madurez de consumo y se manifiestan como manchas circulares café oscuras en el pericarpio y daños por ablandamiento (Prusky *et al.*, 2001; Yakoby *et al.*, 2000). La antracnosis afecta cereales, leguminosas, pastos y cultivos perennes, incluyendo árboles frutales (Owolade *et al.* 2005, Abang 2003, García *et al.* 2000). La descripción de *Colletotrichum* está basada en las características morfológicas (Freeman *et al.* 1998; Lardner *et al.* 1999). Sin embargo la considerable variación que presenta este hongo ha ocasionado dificultades para su clasificación. (Johnston y Jones, 1997; Sutton, 1992).

En la actualidad, el uso de la tecnología basada en el ADN ha permitido contar con nuevas herramientas para la investigación de la variación genética y de los genes que controlan la patogenicidad y especificidad en hongos fitopatógenos (Martin *et al.*, 2000).

Existen diferentes métodos para detectar polimorfismos una de las técnicas muy utilizada es la amplificación de regiones no conservadas del ADN, ya sean ribosomales (ITS) o intergénicas (IGS) (Förster y Adaskaveg, 2000). Estas técnicas trabajan con ADN extraído directamente del individuo en grandes cantidades o con fragmentos de ese ADN amplificado mediante la técnica de PCR (Martin *et al.*, 2000) Aunque las regiones ITS representan solo una parte del genoma, éstas son suficientemente variables para facilitar la separación a nivel de género y son frecuentemente útiles a nivel de especies en los ascomicetes (White *et al.*, 1990).

Este hongo se caracteriza por presentar una amplia gama de hospedantes (Peres *et al.* 2005), el potencial de infección cruzada ha sido reportado entre diferentes especies y genotipos de *C. gloeosporioides* sobre una gran variedad de frutas tropicales, subtropicales y templadas bajo condiciones artificiales de inoculación (Bernstein *et al.*, 1995), este mismo autor ha demostrado que aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* son capaces de infectar manzana, nuez y durazno. Por otro lado Freeman y Shabi., (1996) mostraron que *C. gloeosporioides* aislado de almendro, manzana, aguacate y mango, así como aislamientos de *C. acutatum* aislado de anémona, manzana y durazno, infectan frutos de otros hospederos como manzano, aguacate, almendro, mango y nectarina, esto demuestra el potencial de infección cruzada entre diferentes especies del hongo, lo cual puede implicar un riesgo fitosanitario grave debido a la gran diversidad de cultivos tropicales que existen en México y a los diferentes sistemas de producción en los que los cuales se producen dos cultivos en el mismo predio, en estos sistemas se puede presentar el fenómeno de infección cruzada, debido a que cepas de *Colletotrichum* que son patogénicas para un

cultivo pueden encontrar un hospedero alternativo en el cultivo asociado, la consecuencia puede ser una mayor dispersión de la enfermedad y un incremento en los costos asociados al control. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad que tienen aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos de un fruto específico, para infectar a otros frutos sanos de diferentes especies.

2.3. MATERIALES Y METODOS

2.3.1. Aislamiento del hongo y obtención de cultivos monospóricos.

Se colectaron frutos de diferentes especies y procedencias (Cuadro 1) con síntomas típicos de antracnosis. La colecta se realizó en la Central de Abastos de la Ciudad de México y los frutos se trasladaron al laboratorio de Enfermedades de frutos en Postcosecha del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

Cuadro 1. Aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos de diferentes frutos y procedencias

| AISLAMIENTO | ESPECIE DE FRUTO | LUGAR DE PROCEDENCIA |
|-------------|-----------------------------------------------|----------------------|
| C1BaCo | Banano (<i>Musa paradisiaca</i>) | Colima |
| C2PaMi | Papaya (<i>Carica papaya</i>) | Michoacán |
| C3ChMi | Chile manzano (<i>Capsicum pubescens</i>) | Michoacán |
| C4AgMi | Aguacate (<i>Persea americana</i>) | Michoacán |
| C5CaMi | Carambolo (<i>Averrhoa carambola</i>) | Michoacán |
| C6MtGr | Mango (<i>Mangifera indica</i>) cv. Manila | Guerrero |
| C7MmGr | Mango (<i>Mangifera indica</i>) cv. Ataulfo | Guerrero |
| C8LiCo | Limón Mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i>) | Colima |

De los frutos con síntomas se tomaron cortes de tejido de la parte terminal de la lesión y fueron desinfectados por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos, posteriormente los tejidos se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre sanitas estériles para retirar el exceso de humedad. Para ser sembradas en Papa Dextrosa Agar (PDA).

De cada aislamiento de *Colletotrichum* spp se obtuvo un cultivo monospóricos, utilizando una técnica similar a la utilizada por Manandhar *et al.* (1995). Sobre la colonia de 8 días de edad desarrollada en cajas petri con PDA se colocaron 1000 microlitros de agua destilada estéril con una micropipeta. El agua se mezcló con el micelio y conidios utilizando una varilla de vidrio estéril; posteriormente se recuperaron 100 microlitros de la solución de conidios, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se aforo con agua destilada estéril. El contenido del tubo se vació a una caja de petri con Agua Agar (AA), se distribuyó en toda la caja y se dejó reposar por 5 segundos, posteriormente se desechó todo el exceso de agua contenido en la caja sobre dos sanitas estériles. Cada aislamiento fue incubado a 27 °C durante 24 horas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, de cada aislamiento se seleccionó un conidio individual germinado y se transfirió para su incremento a medio PDA para mantenerse en incubación a 27°C.

2.4. Pruebas de patogenicidad

Para comprobar la patogenicidad, se utilizaron frutos sanos en madurez de consumo. Se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril dos veces. De las cepas de seis días de edad, se prepararon suspensiones de conidios a una concentración de 1×10^5 conidios/mL (Gutiérrez *et al.*, 2003), para contabilizarlos se utilizó un hematocitómetro.

La inoculación, se realizó sobre el pericarpio (cáscara), colocando 20 μ L de la solución de conidios con una micropipeta, sobre heridas de aproximadamente 5 mm de profundidad (Gutiérrez *et al.*, 2003) realizadas con un palillo de madera estéril. Se estableció un testigo, al cual solo se le colocó agua destilada estéril sobre las heridas.

Se realizaron 10 repeticiones, considerando un fruto como una unidad experimental. Los frutos inoculados se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) durante 8 días. De acuerdo con los postulados de Koch, se reaisló el agente una vez que se presentaron los síntomas (Agrios, 2005).

2.5. Identificación morfológica de los aislamientos

Para la identificación de los aislamientos, se consideraron aspectos de la colonia, como el comportamiento en medio de cultivo, morfología de los conidios y de los apresorios. Se usaron 8 aislamientos obtenidos de frutos de diferente especie y procedencias.

Los aislamientos monospóricos se incubaron a $27^\circ\text{C} \pm 1$ en la oscuridad durante 8 días.

Se evaluaron características generales de la colonia, como el color de la colonia, micelio aéreo, plano, denso o escaso y crecimiento a través del tiempo. De cada

aislamiento del hongo se tomaron fotografías con una cámara digital Nikon Colpix p90®.

2.5.1. Color de la colonia

Los métodos de identificación tradicionales, han empleado el color de la colonia como criterio de clasificación de las especies del genero *Colletotrichum*; el color de las colonias se determinó examinando la masa conidial y micelial. Las observaciones de los cultivos se realizó a partir de cepas de 8 días de incubación a 27°C ±1 en cajas petri con PDA a partir de un cultivo monospórico.

2.5.2. Tipo de micelio

El tipo de micelio se determinó mediante la observación directa, teniendo en cuenta los siguientes criterios: micelio aéreo, plano, denso o escaso.

2.5.3. Crecimiento micelial a través del tiempo

Con el propósito de determinar el crecimiento de *Colletotrichum* spp. a través del tiempo, de cada aislamiento, se tomaron discos de 5 mm de diámetro del hongo, se colocaron en cajas petri con PDA y incubaron a 27°C ±1 en oscuridad. Para cada aislamiento, se utilizó una caja de petri como unidad experimental en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Durante 7 días se tomaron lecturas del diámetro polar y ecuatorial de las colonias para posteriormente determinar el área bajo la curva del crecimiento mediante el método de los trapecios (Liengme, 2002). El análisis de varianza se realizó mediante el programa estadístico SAS v.9 para Windows y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad.

2.5.4. Forma y tamaño de conidios

A partir de cada uno de los aislamientos incubados durante 8 días en medio PDA a $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ en oscuridad. Se realizaron preparaciones de conidios permanentes con glicerol al 50 %. Con la ayuda de un microscopio compuesto en el objetivo 40X se tomaron fotografías con una cámara digital instalada en el objetivo del microscopio y con el programa Dino Lite P/N:AM423X, se observaron en una computadora para describir la forma de los conidios, se consideraron 50 conidios al azar por cada aislamiento; de esta manera se describieron las siguientes características: conidios con ambos apéndices redondeados y conidios con un apéndice redondeado y el otro fusiforme (Agostini *et al.* 1992).

Para determinar el ancho y largo de los conidios, se utilizaron las fotografías tomadas anteriormente y se midieron utilizando el programa Dino Lite P/N:AM423X (Figura 1). Se consideraron 50 conidios al azar por cada aislamiento.



Figura 1. Medición de conidios con el programa Dino Lite P/N:AM423X.

2.5.5. Características de los apresorios.

Para inducir la formación de apresorios se utilizó la metodología de Manandhar *et al.* (1995). De cada aislamiento se utilizó una concentración de 5×10^5 conidios/ml, depositando dos gotas de $20 \mu\text{l}$ en un portaobjeto de cristal. El portaobjeto se dejó incubar durante 48 horas a $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, en cámara húmeda, dentro de una caja petri de vidrio con toallas húmedas (Figura 2). Se tomaron fotografías en un microscopio óptico con el objetivo 40X, utilizando el programa Dino Lite P/N:AM423X y se evaluó la forma de los apresorios (Figura 3), considerando 50 apresorios por aislamiento.

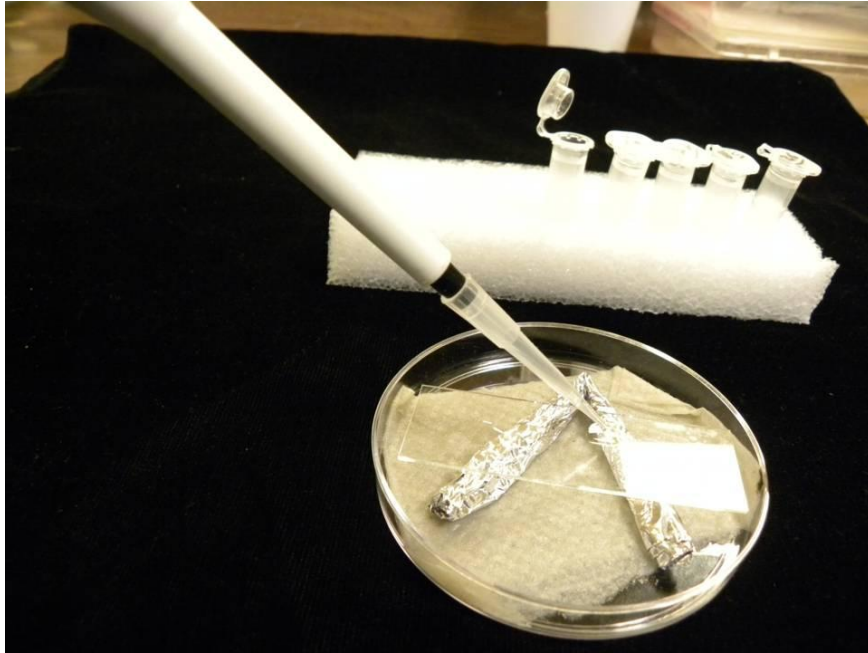


Figura 2. Inducción de apresorios en cámara húmeda.

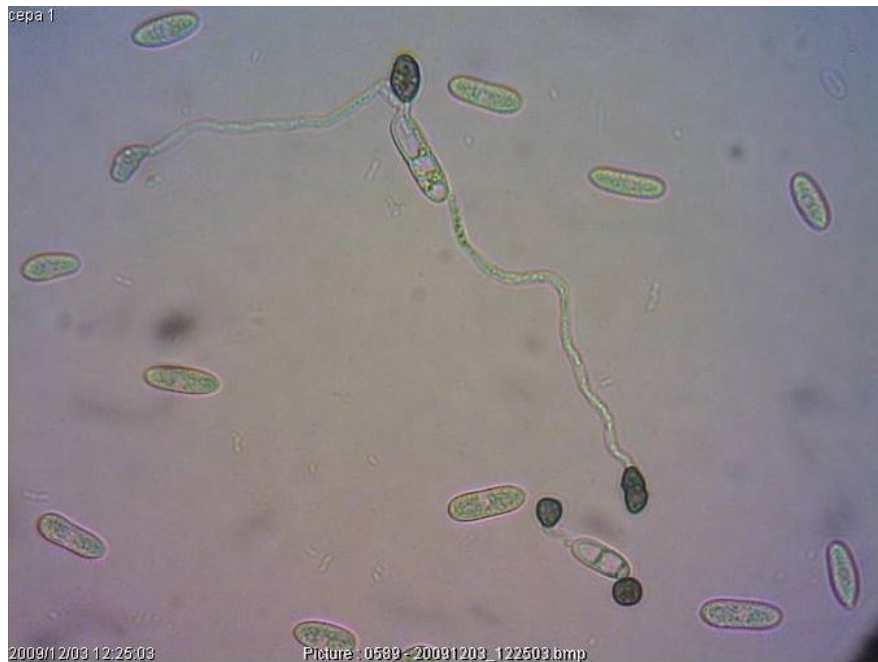


Figura 3. Apresorios de *Colletotrichum*

2.6. Identificación molecular

2.6.1. Extracción de ADN

De cada cultivo monospórico, se realizó la extracción de ADN, con el uso del DNeasy® Mini kit (QUIAGEN). Para esto se tomó una muestra de micelio de *Colletotrichum* sp, se transfirió a un tubo eppendorf, se maceró con una aguja de cristal, se adicionó 400 µL de Buffer AP1 y 4 µL RNasa, se agitó ligeramente, posteriormente las muestras fueron incubadas en baño María por 10 min a 65 °C, se agitó por inversión aproximadamente cada 2 min. Luego se adicionó a la muestra 130 µL del Buffer AP2, y se incubó por 5 min en hielo. La mezcla se colocó en la columna QIAshredder Mini spin lila y se centrifugó por 2 min a 14,000 rpm. Se retiró el sobrenadante para colocarlo en un nuevo tubo eppendorf, al que se le adicionó 675 µL del Buffer AP3/E. La mezcla fue colocada en un tubo DNeasy Mini spin, sometiéndolos a centrifugación por 1 min a 8 000 rpm. En seguida la columna fue reemplazada por otra suplementaria del protocolo, se agregó 500 µL del Buffer AW en la membrana del Mini spin DNeasy y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm. Nuevamente se cambió la columna con el filtrado, se le adicionó a la membrana 500 µL del Buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14, 000 rpm, con el propósito de lavar al ADN. Finalmente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin a un tubo eppendorf, directamente en la membrana se le adicionó 100 µL del Buffer AE del DNeasy, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm (QUIAGEN, 2006). Las muestras se conservaron en refrigeración hasta su uso posterior.

2.6.2. Amplificación del ADN mediante PCR

Con el fin de confirmar el género y determinar la especie de cada aislamiento, se realizó una amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2, ubicadas en los genes ribosomales (rDNA) localizadas entre la subunidad pequeña 18S - 5.8S y la subunidad larga 5.8S - 28S, que fueron amplificadas con la combinación de iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Las condiciones de la PCR usadas para la amplificación, fue la siguiente: agua estéril ionizada (12.145 µL), solución amortiguadora TBE 1X (4 µL), MgCl₂ a 1.5 mM (2.75 µL), dNTP's a 0.2 mM (1.375 µL), *Taq* DNA-polimerasa 1.5 unidades (0.33 µL), iniciadores ITS4 e ITS5 a 10 pM (2 µL) por cada uno y muestra de ADN a una concentración de 20 ng (1 µL). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min por 30 ciclos, alineamiento y extensión a 95 °C por 1 min, 50 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 10 min (While *et al.*, 1990). El producto de PCR se purificó de acuerdo al protocolo del QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN® y se ajustó a una concentración de 50 ng/µL con un volumen de 15 µL. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar en MACROGEN (Corea del Sur). La secuencia obtenida fue comparada con las depositas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.7. Pruebas de patogenicidad cruzada

Con el fin de observar la capacidad que tienen los aislamientos de un fruto específico de infectar a otros frutos sanos en madurez de consumo en postcosecha, se tomó el aislamiento de cada uno de los frutos y se inoculó en frutos de diferentes especies

(Banano, Papaya, Chile manzano, Aguacate, Carambolo, Mango manila y Mango ataulfo), con esto se generaron varios tratamientos, producto de la combinación de siete aislamientos obtenidos de cada uno de los siete frutos e inoculados en frutos distintos a su hospedante original, adicionalmente se inoculó el patógeno en su hospedante original (tratamiento testigo), lo anterior genero 49 tratamientos, además se obtuvo un aislamiento de flores de limón mexicano, que se inoculó sobre frutos de Banano, Papaya, Chile manzano, Aguacate, Carambolo, Mango manila y Mango ataulfo. En total se generaron 56 tratamientos producto de las combinaciones mencionadas anteriormente.

Los frutos inoculados, previamente se desinfectaron con agua y jabón, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril. La inoculación se realizó con conidios obtenidos de cepas con seis a ocho días de edad, a una concentración de 1×10^5 conidios/mL. Se colocaron 20 μ L de la solución de conidios sobre heridas de 5 mm de profundidad realizadas sobre la superficie del fruto (Gutiérrez, 2003).

La unidad experimental fue un fruto y se utilizaron 10 repeticiones para cada aislamiento y un testigo al que únicamente se le colocó agua destilada estéril. Los frutos inoculados y los testigos se mantuvieron siete días en cámara húmeda (100% HR) y temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$). Se midió diariamente el diámetro polar y ecuatorial de la lesión y se obtuvo un promedio, con el cual se calculó el área bajo la curva mediante el método de los trapecios (Liengme, 2002). Estos datos y los del día siete se sometieron a un análisis de varianza mediante el programa estadístico SAS v.9 para

Windows y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad.

2.8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.8.1. Pruebas de patogenicidad

A los tres días después de la inoculación, los frutos presentaron síntomas iniciales de antracnosis (Figura 4), los cuales se manifestaron con la presencia de manchas circulares ligeramente hundidas de color café oscuro en el pericarpio de los frutos, posteriormente se observó la presencia de masas de esporas color naranja o salmón sobre la lesión, estos síntomas coinciden con los reportados por Prusky et al., (2001); Ploetz, (1994) y Dickman, (1994).

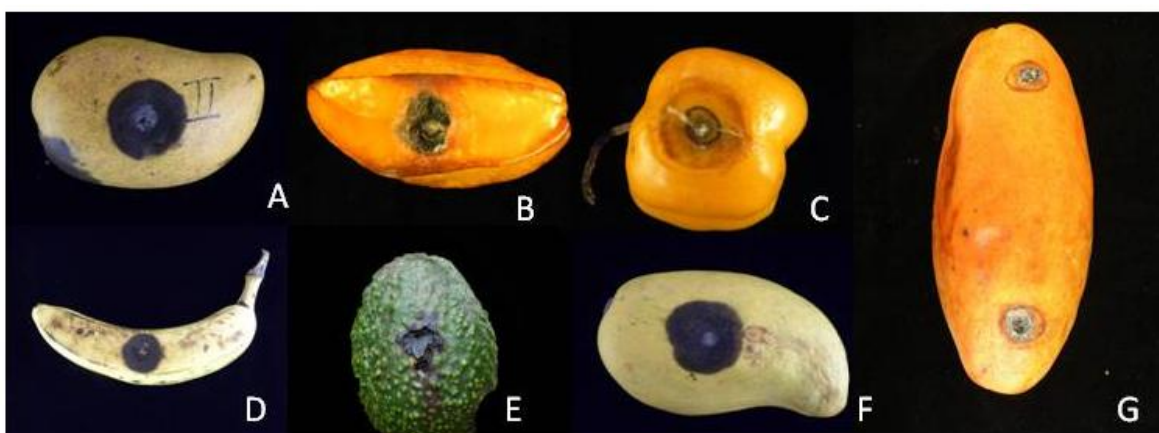


Figura 4. Síntomas de antracnosis en todos los frutos inoculados.

2.8.2. Identificación morfológica de los aislamientos

Las características culturales en PDA de los aislamientos de *Colletotrichum* spp. colectados de diferentes frutos permitieron separar dos grupos diferentes con base a sus características morfológicas, el primer grupo se constituyó por los aislamientos **C2PaMi**, **C3ChMi**, **C4AgMi**, **C5CaMi**, **C6MtGr**, **C7MnGr** y **C8LiCo**, estos aislamientos, presentan colonias de color gris a gris oscuro, con micelio aéreo abundante y algodonoso de color marrón. Por el reverso, el centro de la colonia fue gris ligeramente oscuro con tonalidades de color rosa ligero (Figura 5). En los bordes la coloración es de color claro. Además estos aislamientos presentaron conidios hialinos de forma cilíndrica con ambos lados redondeados, el tamaño promedio de los conidios fue de 12.97 μm de largo y 3.99 μm de ancho estas características coinciden con las reportados por Sutton (1980) y Cano *et al.*, (2004) para la especie *C. gloeosporioides* que son de 9 a 24 μm de largo y 3 a 4.5 μm de ancho. Los apresorios fueron de color café oscuro y forma lobulada, estas características son similares a las reportadas para *C. gloeosporioides*, saprofita o causante de antracnosis en frutos de cítricos en postcosecha; (Agostini *et al.* 1992), adicionalmente otros autores han encontrado características semejantes en colonias de *C. gloeosporioides* (Oliveira *et al.*, 2005). En contraste el aislamiento **C1BaCo** presentó una colonia con abundante micelio algodonoso color blanco, al reverso de la caja presento un color canela a anaranjado claro que a los 7 días formó esporodoquios, éstas características no fueron observadas en el resto de los aislamientos (Figura 5). Los conidios fueron cilíndricos, obtusos en el ápices y truncados en la base, midieron en promedio 16 μm de largo y 4.8 μm de ancho, las características corresponde con las reportado en la literatura para *C. musae* (Bailey and Jerger, 1992).

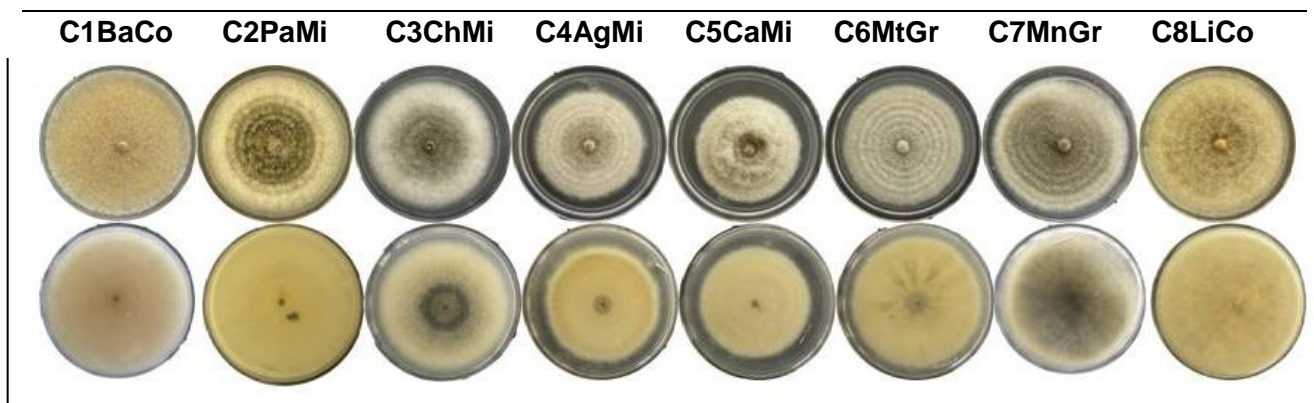


Figura 5. Características de las colonias desarrolladas en PDA de los aislamientos *Colletotrichum*.

2.8.2.1. Crecimiento micelial

El análisis de varianza demostró diferencias estadísticamente significativas entre los aislamientos, de manera que permitió separar a dos aislamientos con respecto a ésta variable. El aislamiento **C1BaCo** mostró un crecimiento más rápido a lo largo de los siete días, lo cual generó un valor de área bajo la curva mayor (248.53), que el del aislamiento **C2PaMi** (167.34), los demás aislamientos no mostraron diferencias estadísticas significativas (Figura 6).

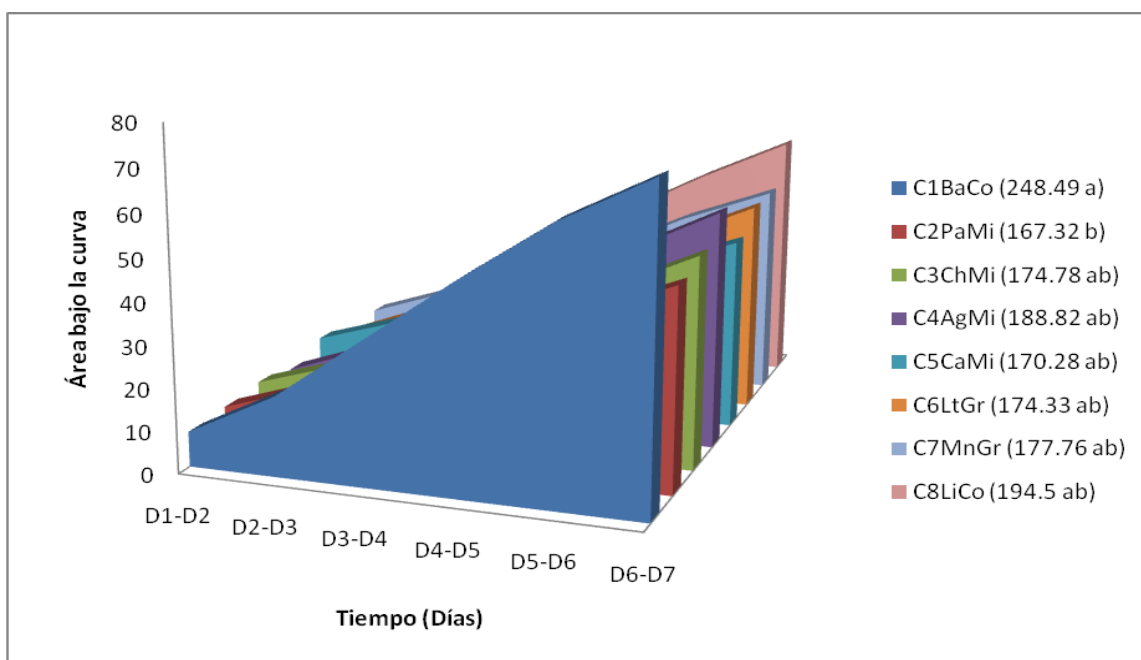


Figura 6. Área bajo la curva acumulada del crecimiento micelial de ocho aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenido de diferentes frutos

El aislamiento **C1BaCo**, que fue aislado de banano procedente de Colima, presenta las características morfológicas correspondientes a *C. musae*. Esta especie se caracteriza por tener una tasa muy alta de crecimiento según lo reportan Couto y Menezes (2004), que encontraron aislamientos de *C. musae* obtenidos de cuatro cultivares de banano que presentaron una tasa de crecimiento micelial elevada, en comparación a *C. gloeosporioides*. El aislamiento **C2PaMi** presentó un crecimiento estadísticamente menor a *C. musae*, sin embargo el resto de los aislamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento micelial con relación al aislamiento **C1BaCo**. En el presente trabajo, se observó que especies diferentes de *Colletotrichum*, mostraron el mismo crecimiento micelial. Este comportamiento coincide con lo encontrado por Villanueva *et al.* (2008), quienes han demostrado que el crecimiento micelial no es un criterio válido para separar especies de *Colletotrichum*, ya que el

hongo manifiesta una gran variabilidad en sus características morfológicas y culturales incluso en aislamientos de la misma especie, lo cual también ha sido reportado por (Bailey and Jerger, 1992; Gutiérrez *et al.* 2001).

2.8.3. Identificación molecular

Las secuencias amplificadas de la región del ITS de los aislamientos, permitió determinar con exactitud la especie de los hongos obtenidos, el aislamiento **C1BaCo** correspondió a *C. musae*, mientras que el **C2PaMi**, **C3ChMi**, **C6MtGr**, **C7MnGr**, **C8LiCo**, **C4AgMi** y **C5CaMi** correspondieron a *C. gloeosporioides*. En el presente estudio las técnicas moleculares fueron útiles para confirmar la especie exacta de los aislamientos, esto es necesario realizarlo para este género, ya que presenta una gran variabilidad genética, que se expresa en variabilidad morfológica, virulencia, agresividad y sensibilidad a fungicidas (Freeman *et al*; 2000).

2.8.4. Patogenicidad cruzada

En el caso del aislamiento **C1BaCo** obtenido de banano y que fue identificado como *C. musae* fue patogénico para frutos de banano (su hospedero original) con un valor de área bajo la curva de 75.65 y papaya con un área bajo la curva de 69.59, mientras que para las demás especies de frutos no fue patogénico. En los frutos de banano *C. musae* fue tan agresivo como en frutos de papaya ya que en ambos frutos ocasionó lesiones estadísticamente iguales a los siete días después de inoculados (Cuadro 2), éste fenómeno posiblemente sea causado a la alta especificidad hacia un hospedante, debido a que el patógeno pierde la capacidad de infectar a otras especies de plantas (Kim *et al.*, 2008). En contraste el aislamiento de *C. gloeosporioides* **C2PaMi**, obtenido

de frutos de papaya mostró un valor de área bajo la curva mayor (60.21) cuando este fue inoculado sobre su hospedante original, sin embargo también fue capaz de infectar a las demás especies de frutos estudiadas, con excepción del carambolo (Cuadro 2 y 3). Este comportamiento fue similar al que presentó el aislamiento **C6MtGr**, que mostró una mayor agresividad sobre su hospedante original que sobre hospedantes alternativos, adicionalmente este aislamiento fue incapaz de infectar frutos de carambolo, como se observó con otros aislamientos. Este mismo comportamiento fue observado por Alahakoon *et al.* (1994) al inocular cepas de *C. gloeosporioides* obtenidas de diferentes frutos sobre hospederos alternos, por ejemplo, aislamientos de aguacate, mango y guayaba fueron capaces de infectar al durian, sin embargo el diámetro de la lesión fue más pequeño que el observado en el hospedante original. Por otro lado los aislamientos **C3ChMi** de chile manzano y el C7MmGr de mango ataulfo, presentaron una agresividad similar tanto en su hospedero original como en los hospederos alternativos (Cuadro 2 y 3). Este fenómeno sugiere que la adaptación de *C. gloeosporioides* a hospederos relativamente resistentes ha dado como resultado el incremento de aislamientos más virulentos de este patógeno, este incremento en la virulencia se puede deber a la mejor adaptación del hongo y no al decremento de la resistencia en el hospedante (Alahakoon *et al.* 1994). Esto podría suponer una evolución más rápida del patógeno debido a que este ha sido sometido a una mayor presión de selección que las plantas cultivadas, así mismo, el manejo de las enfermedades contribuye a que la presión antes mencionada sea mayor.

Cuadro 2. Área bajo la curva del diámetro de la lesión provocado por diferentes aislamientos de *Colletotrichum* sp. inoculados en diferentes frutos.

| | C1BaCo | C2PaMi | C3ChMi | C4AgMi | C5CaMi | C6MtGr | C7MmGr | C8LiCo |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Banano | 75.65 a | 30.20 cbd | 26.51 a | 42.43 bac | 53.94 a | 30.58 bc | 44.54 ab | 31.22 a |
| Papaya | 69.59 b | 60.21 a | 30.76 a | 58.35 a | 42.15 ab | 39.18 b | 63.49 a | 18.58 a |
| Carambola | 0.00 c | 0.00 e | 0.00 b | 54.19 ab | 14.95 c | 0.00 d | 0.00 c | 0.00 b |
| Chile manzano | 0.00 c | 38.79 cb | 34.77 a | 21.77 c | 37.25 ab | 24.00 bc | 44.54 ab | 22.79 a |
| Aguacate | 0.00 c | 26.35 cd | 22.65 a | 31.09 bc | 32.13 bc | 22.37 bc | 19.15 c | 23.15 a |
| Mango cv ataulfo | 0.00 c | 20.19 d | 25.93 a | 30.94 bc | 26.52 bc | 19.74 c | 53.18 ab | 31.22 a |
| Mango cv manila | 0.00 c | 43.74 b | 39.70 a | 22.99 c | 24.99 bc | 74.80 a | 43.01 b | 20.08 a |

C1BaCo= aislamiento de *C. musae* obtenido de banano, **C2PaMi**= aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de papaya, **C3ChMi**= aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de chile manzano, **C4AgMi**= aislamiento de *C.kahawae* obtenido de aguacate, **C5CaMi**= aislamiento de *C.kahawae* obtenido de carambolo, **C6MtGr**= aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de mango cv ataulfo, **C7MmGr**= aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de mango cv manila, **C8LiCo** aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de limón mexicano.

Medias con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Cuadro 3. Diámetro de la lesión en mm en el día siete de evaluación provocado por diferentes aislamientos de *Colletotrichum* sp. inoculado en diferentes frutos

| | C1BaCo | C2PaMi | C3ChMi | C4AgMi | C5CaMi | C6MtGr | C7MmGr | C8LiCo |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Banano | 21.50 a | 10.65 bc | 8.09 ab | 11.82 abc | 14.77 a | 10.30 bc | 18.45 b | 12.28 a |
| Papaya | 22.23 a | 18.39 a | 15.78 a | 18.22 a | 10.52 a | 16.31 ab | 28.06 a | 8.55 a |
| Carambola | 0.00 c | 0.00 d | 0.00 b | 14.20 ab | 1.73 b | 0.00 d | 0.00 d | 0.00 b |
| Chile manzano | 0.00 c | 14.96 ab | 7.67 ab | 6.23 bc | 9.50 ab | 9.32 bc | 18.45 b | 9.85 a |
| Aguacate | 0.00 c | 8.30 bc | 7.78 ab | 5.18 c | 10.21 a | 8.37 c | 6.72 c | 9.36 a |
| Mango cv ataulfo | 0.00 c | 4.53 cd | 9.09 ab | 11.25 abc | 8.38 a | 6.41 cd | 13.698 b | 10.16 a |
| Mango cv manila | 0.00 c | 15.50 ab | 13.42 a | 8.16 d | 7.70 a | 19.46 a | 15.50 b | 7.49 a |

C1BaCo= aislamiento de *C. musae* obtenido de banano, **C2PaMi**= aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de papaya, **C3ChMi**= aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de chile manzano, **C4AgMi**= aislamiento de *C.kahawae* obtenido de aguacate, **C5CaMi**= aislamiento de *C.kahawae* obtenido de carambolo, **C6MtGr**= aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de mango cv ataulfo, **C7MmGr**= aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de mango cv manila, **C8LiCo** aislamiento de *C. gloeosporioides* obtenido de limón mexicano.

Medias con letras iguales entre columnas no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Los aislamientos **C4AgMi** y **C5CaMi** obtenidos de aguacate y carambolo respectivamente y que también fueron identificados como *C. gloeosporioides*, presentaron un comportamiento diferente ya que ocasionaron un mayor daño en hospederos alternos que en su hospedante original, además ambos aislamientos fueron más agresivos en banano y papaya que en su hospedero original, estos resultados confirman lo reportado por Freeman (2000), quien menciona que este hongo presenta una gran variabilidad, la cual se expresa en mayor virulencia y agresividad. Adicionalmente el aislamiento **C5CaMi** ocasionó un daño importante en chile manzano, aguacate y mango, este comportamiento podría ser característico de esta especie. El aislamiento **C8LiCo** ocasionó infecciones en todos los frutos inoculados a excepción de carambolo, en los frutos infectados el diámetro de la lesión no mostro diferencias estadísticas (Cuadro 2 y 3).

2.8.5. CONCLUSIONES

Tanto la identificación morfológica como la molecular permitieron distinguir dos especies de *Colletotrichum* sp. Los resultados en el presente trabajo demostraron que el fenómeno de infección cruzada ocurre entre aislamientos de *C. gloeosporioides* aislado de papaya, chile manzano, mango manila y mango ataulfo. Los aislamientos presentan una mayor agresividad en el hospedante original y aunque hospedantes alternativos presentan síntomas estos se dan en menor intensidad. En otro caso, como fue el de los aislamientos provenientes de chile manzano y mango ataulfo, presentaron la misma agresividad en todos los frutos inoculados. El aislamiento identificado como *C. musae* mostró un rango de hospedantes más limitado que otras especies, ya que solo afectó a banano (hospedante original) y papaya. En contraste, los aislamientos de aguacate y

carambolo que también fueron identificados como *C. gloeosporioides*, fueron más agresivos en hospedantes alternativos que a su hospederos originales. El fruto de carambolo presento una mayor tolerancia a la inoculación de diferentes aislamientos de *Colletotrichum*, y fue afectado únicamente por los aislamientos **C4AgMi** proveniente de aguacate y **C5CaMi** proveniente de la misma especie de fruto. Los frutos que mayor susceptibilidad presentaron fueron banano y papaya, ya que fueron afectados por todos los aislamientos.

2.8.6. LITERATURA CITADA

- Abang M M (2003)** Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Causing anthracnose disease of yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Bibliotheca Mycologica*. v. 197.
- Afanador K L D Minz M Maymon M S Freeman (2003)** Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, pasiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93:579-587.
- Agostini J P, L W Timmer, D J Mitchell (1992)** Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82:1377-1382.
- Agrios G N (2005)** *Plant Pathology*. Fifth edition. Elsevier academic press pp:922
- Alahakoon P W, A E Brown, S Sreenivasaprasad (1994)** Cross-infection potential of genetic groups of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44:93-103.
- Alcalá M D, N Vargas, A Pire (2005)** Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Rev. Fac. Agron.* 22: 315-323.
- Amadioha A C (2004)** Control of black rot of potato caused by *rhizoctonia bataticola* using some plant leaf extracts. *Phytopathology and Plant Protection*.37:111–117.
- Bailey J A, M J Jeger (1992)** *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB Berlin, Stuttgart: J. Cramer in der Gebr. Borntraeger Science Publishers. pp:139.

Barnett H L, B B Hunter (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta edición. Minnesota. APS Press.218 p.

Becerra L E N (1995) Enfermedades del cultivo de mango. *In*: La producción de Mango en México. B I Mata, V R Mosqueda (1995) Noriega editores. México. pp:84-86

Bergstrom G C, R L Nicholson (1999) The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease* 83:596-608.

Bernstein B, E I Zehr, R A Dean, E Shabi (1995) Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Dis.* 79:478-482.

Blanchard G, C L Campbell, L T Lucas (1992) Introduction to Plant Diseases: Identification and Management. Norwell, Massachusetts. Kluwer Academic Publishers. Second edition 364p.

Cano J, J Guarro, J Gené (2004) Molecular and Morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology* 42:2450-2454.

Casarrubias C U, C M M González, H A Cruz, S E Cárdenas, A D Nieto, G R Guevara, R G
caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease* 76:976-981.

Correa G, L Lavalett, M P Galindo, L Afanador (2007) Use of multivariate methods for grouping strains of *colletotrichum* spp. Based on Cultural and morphological characters. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*.60 (1):3671-3690.

Couto E F, M Menezes (2004) Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. *Fitopatología Brasileira*.29:406-412.

Davis R D, S Chakraborty, D F Cameron, JA G Irwin, R M Boland (1994) The influence of mixtures of *Stylosanthes* spp. accessions on the occurrence of

anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Australian Journal of Agricultural Research. 45:203–210.

De Marcano A D, N Vargas, A Pire (2005) Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Rev. Fac. Agron. 22: 315-323

Dickman M B (1994) Anthracnose. *In*: Papaya Diseases Caused by Fungi. R C Ploetz, G A

Dodd J C, A Estrada, M J Jeger (1992) Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics. *In*: *Colletotrichum: biology pathology and control*. J A Bailey, M J Jeger, (eds). Wallingford, U.K.: CAB International pp:308- 325.

FAO (2010). Comercios y Mercados. www.fao.org/es/esc/es. Consultado el 23 de febrero del 2010.

Femenia R M E (2007) Caracterización Química de cepas de hongos del género de *Colletotrichum*: Síntesis de Gloeosporiol. Diseño y síntesis de modelos de agentes fungicidas. Tesis de Doctorado en ciencias. Universidad de Cádiz. Puerto Real. 346p.

Förster H, J E Adaskaveg (2000) Early brown rot infection in sweet cherry fruit are detected by *Monilinia*-specific DNA primers. *Phytopathology* 90:171-178.

Frederiksen R A (1984) Anthracnose stalk rot. pp. 34-42. *In* Sorghum root and stalk rots, a critical review. Proceedings of the Consultative Group Discussion on Research Needs and Strategies for Control of Sorghum Root and Stalk Rot Diseases. Bellagio, Italy. ICRISA.

- Freeman S (2000)** Genetic diversity and specificity of *Colletotrichum* species on various fruits.. *In: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. D Prusky, S Freeman, M B Dickman. (eds.) The American Phytopathological Society, St. Paul. pp:131-141
- Freeman S, D Minz, E Jurkevitch, M Maymon, E Shabi (2000)** Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90:608-614.
- Freeman S, T Katan, E Shabi (1998)** Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-605.
- Freeman S, E Shabi (1996)** Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various host. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49:395-404.
- Garcia M J A, M B Soares, I Grondona, E Monte, A G Buddie, P D Bridge, P F Cannon, (2000)** A physiological and biochemical approach to the systematics of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*.92:488-498.
- González (2003)** Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. Aislado de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:338-345.
- González M, R Rodríguez, M E Zavala, J L Jacobo, F Hernández, J Acosta, O Martínez, J Simpson (1998)** Characterization of mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88:292-299.
- Guarro J, T E Svidzinski, L Zaror, M H Forjaz, J Gené, O Fischman (1998)** Subcutaneous Hyalohyphomycosis Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Clinical Microbiology*. 36:3060-3065.

- Guerber J C, B Liu, J C Correl (2003)** Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95:872–895.
- Gutiérrez A J G, A O Gutiérrez, A D Nieto, O D Téliz, M E Zavaleta, S F Delgadillo, H H Vaquera (2003)** Evaluación de resistencia a imazlil, prochloraz y azoxystrobin en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. Y control de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:379-383.
- Harbone J B (1973)** Phytochemical methods. 2 ed. Chapman and hall editores. 208 pp.
- Hernandez C A C (2006)** Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Mangifera indica* L) y tallos de mora (*Rubus glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. Tesis para obtener el grado en Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Facultad de ciencias básicas Bogotá. 115p
- Holliday P (1995)** Fungus diseases of tropical crops. Dover Publication, Inc. New York. 624p.
- Howard C M, J L Maas, C K Chandler, E E Albrechts (1992)** Anthracnose of strawberry
- Jeffries P, J C Dodd, M J Jeger, R A Plumbley (1990)** The biology of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*. 39:343-366
- Johnston P R, D Jones (1997)** Relationships among *Colletotrichum* species from fruit-rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89:420-430.

- Jones y Slabaugh (1994)** Effect of foliar infectio caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russet Burbank potato. pp 11. *In* Patogenicidad, Variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en Mexico. Tesis de Doctorado para obtener el grado en Biotecnología Microbiana, Facultad de ciencias Biologicas y Agropecuarias, Colima. 105p.
- Kim K D, B J Oh, J Yang (2001)** Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporoides* isolate with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica* 27:1-10.
- Lardner R, P R Johnston, K M Plummer, M N Pearson (1999)** Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. *Mycological Research* 103(3):275-285.
- Lenné (1992)** *Colletotrichum* diseases of legumes. *In: Colletotrichum: biology pathology and control.* J A Baily, M J Jeger (eds). Wallingford, U.K.: CAB International. pp:134-166
- Lewin B (2004)** *Genes VIII.* Eighth Edition. Pearson Prentice Hall. New York. United States of America. pp:1027.
- Liengme B V (2002)** *A guide to Microsoft Excel for scientists and engineers.* (2 ed.). Butterworth- Heinemann. 271p.
- Loos R, P Frey (2000)** Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. *Eur. J. Plant Pathology* 106:373-378.
- Manandhar J B, G L Hartman, T C Wang (1995)** Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum capsici* y *C. gloeosporioides* isolates from pepper. *Plant Disease* 79:361-366.

- Manners J M, A Masel, J A G Irwin (1993)** Molecular genetics of *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes*. *In: Aspects of tropical mycology* S Isaac, J C Frankland, R Watling, A J S Whalley. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. pp: 233-249.
- Mari M, O Leoni, R Lori, T Cembali (2002)** Antifungal vapour-phase activity of allyl isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears. *Plant Pathology*. 51: 231–236.
- Mari M, O Leoni, R Lori, A Marchi (1996)** Bioassay of glucosinolate derived isothiocyanates against post harvest pear pathogens. *Plant Pathology*. 45: 753–760
- Martin R R, D James, C A Levesque (2000)** Impacts of molecular diagnostic technologies of plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol*. 38: 207- 239
- Mass J L (1983)** Anthracnose of strawberry fruit in Maryland. *Plant Disease Reporter*. 62:488-492.
- Millán C (2008)** Las plantas: una opción saludable para el control de plagas. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina. Uruguay. pp:110 pág.
- Mosqueda V R, B I Mata (1995)** La producción del mango en México. Limusa. México D.F. pp:84-86.
- Nicholson R L (1992)** *Colletotrichum graminicola* and the Anthracnose disease of maize and sorghum. *In: Colletotrichum: biology pathology and control*. J A Baily, M J Jeger (eds). Wallingford, U.K.: CAB International pp:186- 202.

- Nuckles E M, J Kuc (1988)** Induced resistance to anthracnose in cucumber. *In:* Laboratory exercises in plant pathology: an instructional kit. A B A M Baudoin. (ed.). The American Phytopathology Society, St. Paul. pp:16-18.
- O'Connell R, C Herbert, S Sreenivasaprasad, M Khatib, M T Esquerré-Tugayé, B Dumas (2004)** A novel Arabidopsis-Colletotrichum pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:272-282.
- Oliveira H, P Talhinhos, P Ferreira (2005)** Espécies de Colletotrichum responsáveis pela gafa da oliveira em Portugal. Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, Lisboa, Portugal pp:7.
- Orozco S M (2006)** Patogenicidad, Variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en Mexico. Tesis de Doctorado para obtener el grado en Biotecnología Microbiana, Facultad de ciencias Biológicas y Agropecuarias, Colima. 105p.
- Orozco S M (1984)** Estimación del daño causado por la caída de fruto pequeño y su control químico en naranja Valencia. *In:* XI Congreso Nacional de la sociedad Mexicana de Fitopatología. San Luís Potosí, México. pp:64.
- Owolade O F, A G O Dixon, A A Adeoti, S O Osunlaja (2005)** Sources of resistance to Cassava anthracnose disease. *En: African Journal of Biothechnology.* 4:570- 572.
- Peres N A, L W Timmer, J E Adaskaveg, J C Correll (2005)** Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89:784-796.

Perfect S E, H B Hughes, O R O'Connell, J R Green (1999) *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198.

Ploetz R C, G A Zetmyer, W T Nishijima, K G Rohrbach, H O Orh (1994) Compendium of tropical fruit diseases. APS Press, St Paul.pp:88.

Prusky D, J McEvoy, R Leverentz, W Conway (2001) Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology* 9:1105-1113

Prusky D, I Kobiler, R Ardi, D M Beno, N Yakoby, N T Keen (2000) Resistancce Mcchanisms of subtropical fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. In: *Colletotrichum*. Host speciticity pathology and host-pathogen interaction. D Prusky, S Freeman, M B Dickman. (eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul. pp:232-244

QIAGEN (2006) Sample & Assay Technologies

http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/weeklyarticle/06_05/e5/default.aspx.

Revisado el 22 de marzo de 2010.

Reyes D A O (2008) Caracterizacion patológica de cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz). Penz & Sacc. En plantas de mango (*Manguifera indica* L.) y papaya (*Carica papaya* L.) y servicios realizados en la estación ICTA-CISUR, CUYUCA, ESCUINTLA. Tesis de Grado de Académico de Licenciado. Guatemala, 141p.

Rodríguez G A. F (2007) Caracterizacion molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnostico del

CBD. Tesis para obtener el título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá. 126p

Rodríguez A S, E A Rosa (1999) Effect of post-harvests treatments on the level of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica). Journal of the science of food and agricultura.79:1028–1032.

Rodriguez F (1982) El aguacate. AGT Editor, México D. F. pp:167.

Sicard D, Y Michalakis, M Dyron, C Neema (1997) Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. Phytopathology 87:807-813.

Stanley F, K Talma, S Ezra (1998) Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Disease of Various Fruits. Plant Disease 82:596-605.

Sutton B C (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds.). CAB International. Wallingford, U.K. pp:1-26

Tarr A J (1962) Diseases of sorghum, Sudan grass and Broomcorn. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 380 pp.

Tropical Fruit Diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp: 58-59.

Vidales J A (1997) Sensibilidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) a diferentes fungicidas usados en aguacate (*Persea americana*) en postcosecha. Memorias del XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Resumen pp:50.

- Villanueva A, R, M M J Yáñez, A A M Hernández (2008)** Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia*. 42:689-701
- Villanueva R A (2004)** Caracterización morfológica y molecular de *Colletotrichum* spp. e histopatología de la antracnosis causada por *C. fragariae* en frutos de chirimoya (*Annona cherimola* mill.) tesis para obtener el grado de doctorado. colegio de postgraduados. México. 98p
- Von Arx J (1957)** Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Corda. *Phytopath. Zeitschrift*. 29:413-468.
- Waller J M, P D Bridge, B Black, G Hakiza (1993)** Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycological Research* 97: 989-994
- Waller J M (1992)** *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: Bailey, J. A. and Jeger, M. J. (eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, UK. pp. 167-185
- Wharton P S, U J Diéguez (2004)** The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61:3-22.
- White T J, T Bruns, S Lee, J W Taylor (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. M A Innis, D H Gelfand, J Sninsky, J T White (eds) Academic Press. New York. pp:315-322.
- Wink M (1999)** Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. *Annual plant reviews*. Vol 3. Sheffield Academic Press, Sheffield. pp:362.

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

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

3. CAPITULO III. EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS VEGETALES PARA EL CONTROL *IN VITRO* DE *Colletotrichum gloeosporioides* Penz

3.1. RESUMEN

La antracnosis provocada por *C. gloeosporioides*, es la enfermedad postcosecha más importante en las áreas productoras de mango. Actualmente la estrategia más empleada para el control de la enfermedad, son los fungicidas, sin embargo su uso está restringido debido al conocimiento de sus residuos peligrosos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes proporciones de solventes para obtener extractos vegetales con actividad biológica en contra de *C. gloeosporioides* aislado de frutos de mango. Se utilizaron diente de ajo, floretes de brócoli, hojas de zacate limón y semillas de neem. Los materiales vegetales se colocaron en agitación durante treinta minutos a 80°C en diferentes combinaciones de metanol:agua (0:100, 30:70, 50:50, 70:30 y 100:0 v/v). Posteriormente se prepararon cajas petri con los extractos obtenidos de los materiales vegetales a una concentración del 20% (v/v) lo cual generó 21 tratamientos. Los mejores extractos en cuanto a efectividad y costo fueron ensayados en un segundo experimento para determinar la DL₅₀ en contra de *C. gloeosporioides*. Los resultados mostraron que el poder de inhibición, varió en función de la proporción de metanol y agua utilizada, para el caso de té limón la cantidad mínima de metanol para obtener un 100% de efectividad fue del 86.6% v/v. Por otro lado el extracto de brócoli solo alcanzó la máxima efectividad con un extracto realizado en una proporción de metanol:agua 100:0. En contraste los extractos acuosos de neem y de ajo mostraron una efectividad del 100%. Adicionalmente el extracto acuoso de ajo mostró una DL₅₀ a una

concentración de 4.23%, mientras que la CL₅₀ para el extracto de zacate limón en una proporción metanol: agua 70:30 fue de 13.03%.

3.2. INTRODUCCIÓN

La antracnosis del mango (*Mangifera indica* L), causada por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, es una de las enfermedades de mayor importancia económica a nivel mundial en este cultivo, en condiciones de campo, donde el hongo ataca hojas, ramitas, inflorescencias, frutos, y en postcosecha, donde afecta los frutos almacenados y causa la pérdida del valor comercial de los mismo (Rondón *et al*; 2006).

Actualmente, las medidas que se aplican en México para el control de la antracnosis incluyen una combinación de métodos físicos y químicos (Droby, 2000). Las fallas frecuentes en dosificación, el uso excesivo de fungicidas y su incorrecta aplicación han provocado que el hongo desarrolle resistencia, lo que hace cada día más difícil el control de la enfermedad (Gutiérrez *et al.*, 2003). Lo anterior pone en evidencia la necesidad de probar métodos alternativos como el control biológico y la resistencia inducida por infección cruzada, que contribuyan al desarrollo y aplicación de métodos de control integrado de la antracnosis (Nuckles y Kuc, 1988).

Actualmente se han utilizado métodos a través de plantas alelopáticas, ya sea en combinación con los cultivos o en preparados para combatir las plagas y enfermedades, ya que existen plantas con propiedades plaguicidas y/o repelentes, que se pueden aplicar en forma de macerados (Amorim *et al.*, 2004). La agricultura agroecológica apunta a evitar las plagas para no tener que combatir las y no dominar la naturaleza sino

vivir en armonía con ella (Millán, 2008), este mismo autor menciona al ajo como una especie de plantas con propiedades fungicidas, de igual forma Amadioha (2004) evaluó con resultados favorables, extractos de neem (*Azadirachta indica*) y zacate limón (*Cymbopogon citratus*), para el control de *Rhizoctonia bataticola*.

Considerando la importancia de encontrar métodos alternativos a los productos químicos sintéticos y de los extractos vegetales como alternativa para el control de hongos fitopatógenos, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de extractos crudos, de dientes de ajo (*Allium sativum*), brócoli (*Brassica oleracea*), neem (*Azadirachta indica*) y zacate limón (*Cymbopogon citratus*), preparados mediante diferentes métodos para el control *in vitro* de *Colletotrichum gloesporioides* Penz.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Aislamiento del hongo y pruebas de patogenicidad

Se colectaron frutos de mango cv manila con síntomas típicos de antracnosis, procedentes de Estado de Guerrero, se utilizaron trozos de tejido con síntomas, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos, se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Con el propósito de trabajar con cepas obtenidas a partir de una sola célula, se prepararon cultivos monospóricos utilizando una técnica similar a la utilizada por Manandhar *et al.* (1995).

Para comprobar la patogenicidad del hongo, se utilizaron frutos sanos en madurez de consumo. Se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril dos veces. La inoculación,

se realizó sobre el pericarpio (cáscara), colocando con una micropipeta 20 µL de una solución de conidios con a una concentración de 1×10^5 conidios/mL sobre heridas de aproximadamente 5 mm de profundidad (Gutiérrez *et al.*, 2003) realizadas con un palillo de madera estéril. Además se estableció un testigo, al cual solo se le colocó agua destilada estéril sobre las heridas. Se realizaron 10 repeticiones, considerando un fruto como una unidad experimental. Los frutos inoculados se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente (24 ± 2 °C) durante siete días. De acuerdo con los postulados de Koch, se reaisló el agente causal una vez que se presentaron los síntomas (Agrios, 2005).

3.3.2. Identificación morfológica y molecular

La identificación morfológica se realizó mediante las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1986), y las de Sutton (1992). Las estructuras reproductivas fueron foto documentadas y medidas utilizando una cámara digital (Dino Lite P/N:AM423X), controlada por una computadora personal (Dell, USA). La identificación molecular fue realizada después de extraer los ácidos nucleídos utilizando un kit comercial (Quiagen, USA), Con el fin de confirmar el género y determinar la especie del aislamiento, se realizó una amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2, ubicadas en los genes ribosomales (rDNA) localizadas entre la subunidad pequeña 18S - 5.8S y la subunidad larga 5.8S - 28S, que fueron amplificados con la combinación de iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La secuencia obtenida fue comparada con las depositas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.3.3. Obtención de extractos vegetales

Se realizó extracto crudo de dientes de ajo (*Allium sativum*), brócoli (*Brassica oleracea*), neem (*Azadirachta indica*) y zacate limón (*Cymbopogon citratus*). Para su obtención se utilizó la técnica propuesta por Harbone (1973). Para cada especie vegetal se utilizó una mezcla de metanol y agua en porciones variables del cual se obtuvieron 20 tratamientos más un testigo comercial y un testigo absoluto (Cuadro 4).

Se pesaron 43 gramos de dientes de ajo, se molieron durante un minuto con 150 ml de la mezcla de solventes correspondientes (metanol y agua). Se vació en un vaso de precipitado de 500 ml y se agitó en una plancha de agitación con ayuda de una mosca, durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se filtró hasta obtener 100 ml de solución y se concentró en una plancha a 60°C, hasta alcanzar 50 ml, es decir el 50% del volumen original. El extracto se colocó en un frasco con tapa, cubriéndolo con papel aluminio para evitar la fotodegradación de las clorofilas presentes en el extracto, y se etiquetó. Este procedimiento se realizó de igual forma para los extractos de brócoli, neem y zacate limón. Para el caso del brócoli se utilizaron 200 gramos de floretes frescos y 300 ml de los solventes correspondientes (metanol y agua); para neem se pesaron 10 gramos de polvo seco de semillas y se colocaron 100 ml de los solventes correspondientes (metanol y agua); finalmente se pesaron 40 gramos de hojas de zacate limón frescas y se utilizaron 200 ml de la mezcla de solventes correspondientes (metanol y agua).

Cuadro 4. Tratamientos, resultado de las proporciones de metanol:agua para cada especie vegetal.

| TRATAMIENTO | VEGETAL/gramos | PROPORCIÓN METANOL:AGUA (V/V) |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 1 | Neem, 10 | 100:0 |
| 2 | Neem, 10 | 70:30 |
| 3 | Neem, 10 | 50:50 |
| 4 | Neem, 10 | 30:70 |
| 5 | Neem, 10 | 0:100 |
| 6 | Ajo, 40± 2 | 100:0 |
| 7 | Ajo, 40± 2 | 70:30 |
| 8 | Ajo, 40± 2 | 50:50 |
| 9 | Ajo, 40± 2 | 30:70 |
| 10 | Ajo, 40± 2 | 0:100 |
| 11 | Brócoli, 200± 2 | 100:0 |
| 12 | Brócoli, 200± 2 | 70:30 |
| 13 | Brócoli, 200± 2 | 50:50 |
| 14 | Brócoli, 200± 2 | 30:70 |
| 15 | Brócoli, 200± 2 | 0:100 |
| 16 | Zacate limón, 40± 2 | 100:0 |
| 17 | Zacate limón, 40± 2 | 70:30 |
| 18 | Zacate limón, 40± 2 | 50:50 |
| 19 | Zacate limón, 40± 2 | 30:70 |
| 20 | Zacate limón, 40± 2 | 0:100 |
| 21 | Testigo químico (Tiabendazol) | Dosis recomendada |
| 22 | Testigo absoluto | |

3.3.4. Efectividad biológica de los extractos *in vitro*

Los extractos se adicionaron al medio de cultivo PDA aun en estado líquido a una temperatura entre 32 y 36 °C. Estos extractos se evaluaron a una concentración del 20%, para determinar el efecto sobre el crecimiento micelial del hongo, además

determinar las proporciones adecuadas de metanol:agua para obtener un mayor control del patógeno. El PDA con los extractos, se dejó reposar 48 horas.

Posteriormente se realizó la siembra del hongo, colocando en el centro de una caja petri con PDA + los tratamientos, una rodaja de 5 mm de diámetro de PDA con micelio del hongo. Los discos se incubaron $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y en luz fluorescente continua. Se utilizó una caja de petri como unidad experimental en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Durante 7 días se tomaron lecturas del diámetro polar y ecuatorial de las colonias para posteriormente determinar el área bajo la curva del crecimiento mediante el método de los trapecios (Liengme, 2002). El análisis de varianza se realizó mediante el programa estadístico SAS v.9 para Windows y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de efectividad por medio de la formula de Abbott (1925).

La formula de Abbott para calcular la efectividad de los productos es la siguiente:

$$ET = \frac{ST - st}{ST} \times 100$$

Donde:

ET = Eficacia del tratamiento.

ST = Porcentaje de severidad en el testigo.

st = Porcentaje de severidad en cada tratamiento.

Para determinar que extractos resultaron ser los mejores no solo desde el punto de vista biológico, sino económico, se calcularon los costos de cada uno de los extractos, por concepto de precio y cantidad de material vegetal y metanol utilizado.

3.3.5. Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀)

Los extractos que mostraron mayor efectividad y menor precio, fueron utilizados en un segundo bioensayo para determinar la CL₅₀. Los mejores extractos se adicionaron al medio de cultivo PDA líquido a una temperatura entre 32 y 36 °C. Se evaluaron a las concentraciones 1, 5, 10, 15 y 20 % para determinar la CL₅₀.

Se colocó una rodaja de 5 mm de diámetro de PDA con micelio del hongo en el centro de la caja petri con PDA y el extracto. Los discos se incubaron a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y en luz fluorescente continua. El crecimiento micelial (diámetro de las colonias en mm) se evaluó durante 7 días, usando un vernier digital. Con los datos de crecimiento se determinó el área bajo la curva de cada una de las repeticiones, con estos se construyó un modelo de regresión lineal y se calculó la CL₅₀ por medio del comando solver de Microsoft Excel®.

3.6. RESULTADOS Y DISCUSION

3.6.1. Pruebas de patogenicidad

A los 3 días después de la inoculación, los frutos presentaron síntomas iniciales de antracnosis, los cuales se manifestaron con la presencia de manchas circulares ligeramente hundidas de color café oscuro en el pericarpio de los frutos, posteriormente

se observó la presencia de masas de esporas color naranja o salmón sobre la lesión, estos síntomas coinciden con los reportados por Prusky *et al.*, 2001.

3.6.2. Identificación del agente causal de la antracnosis

El aislamiento, presentó colonias de color gris a gris oscuro, con micelio aéreo, abundante y algodonoso de color marrón. Por el reverso, el centro de la colonia fue gris ligeramente oscuro con tonalidades de color rosa ligero, en los bordes la coloración fue de color claro. Presentó conidios hialinos de forma cilíndrica con ambos lados redondeados, el tamaño promedio de los conidios fue de 12.97 μm de largo y 3.99 μm de ancho estas características coinciden con las reportados por Sutton (1992) y Cano *et al.*, (2004) para la especie *C. gloeosporioides* que son de 9 a 24 μm de largo y 3 a 4.5 μm de ancho. Los apresorios fueron de color café oscuro y forma lobulada, lo cual coincide con el trabajo de Agostini *et al.* (1992).

La secuencia del ITS amplificada coincidió en 98 % con *C. gloeosporioides*, por lo tanto las características morfológicas como las moleculares corresponden a la misma especie de hongo.

3.6.3. Efectividad biológica de los extractos *in vitro*

El análisis de varianza, mostró diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos ($P \leq 0.001$), además el coeficiente de determinación ($r^2 = 0.96$) fue aceptable para describir el efecto de los diferentes extractos sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

En general, la mayoría de los tratamientos inhibieron el crecimiento del hongo, en un porcentaje mayor al 50% en relación con el testigo. Los tratamientos menos efectivos fueron los extractos acuosos de zacate limón y brócoli con un porcentaje de 5.20 y 9.38% respectivamente, por otro lado los extractos de brócoli en metanol agua 30:70 v/v y metanol agua 50:50 v/v mostraron una efectividad menor al 50% (Cuadro 4). En algunos extractos, la proporción de metanol y agua utilizada en la preparación del extracto, influye significativamente en el porcentaje de efectividad, esto se puede observar en el extracto metanólico de brócoli (metanol agua 100:0 v/v) que mostró una efectividad mayor (94.73%) en relación al extracto de la misma especie utilizando una proporción metanol agua de 70:30 v/v (73.08%). La efectividad fue a un menor, cuando la proporción de metanol disminuyó a 50:50 o 30:70 metanol: agua v/v, con porcentajes de efectividad de 45.89 y 38.92 respectivamente (Cuadro 6).

El mismo fenómeno se observó para el caso del zacate limón ya que mientras un extracto preparado en metanol agua en una proporción 100:0, mostró un porcentaje de efectividad del 100%, un extracto de la misma planta, preparado en una proporción metanol agua 0:100 v/v, solamente mostró una efectividad del 5.27%. En contraste, los extractos de diente de ajo y neem, mostraron una efectividad del 100% independientemente de la proporción metanol agua utilizada para realizar el extracto. Debido a que el metanol es un reactivo que incrementa el costo de los extractos, es deseable que en la preparación de los mismos se utilice la menor cantidad posible de este. Por lo tanto en aquellos tratamientos en los cuales la efectividad del extracto metanólico es igual a la del extracto acuoso, lo más indicado sería utilizar el extracto acuoso. Este criterio permite, por un lado, disminuir los costos de preparación de los

extractos y por otro mantener la efectividad de los mismos. El brócoli mostró una efectividad tan alta como la del ajo y el neem, pero solo cuando se utilizó extracto metanólico, por lo cual el mejor extracto de brócoli es el metanólico (metanol-agua 100:0 v/v). Los extractos que mostraron el menor precio fue el extracto de diente de ajo acuoso y el extracto de zacate limón en una proporción metanol:agua 70:30 v/v (Cuadro 5). En cuanto al neem, a pesar que su efectividad fue alta, no cuenta con una fuente comercialmente disponible de esta especie, por lo cual no se consideró para calcular la CL_{50} (Cuadro 6).

Cuadro 5. Determinación de los costos para preparar 100 ml de extracto crudo

| Vegetal | Proporción Metanol-Agua v/v | Precio del material vegetal para 100 ml de extracto crudo (\$) | Precio de metanol para 100 ml de extracto crudo * (\$) | Precio total para 100 ml de extracto crudo (\$) |
|--------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Ajo | 0:100 | 4.00 | 0.00 | 4.00 |
| Brócoli | 100:0 | 1.60 | 24.90 | 26.50 |
| Zacate Limón | 70:30 | 7.00 | 16.60 | 23.60 |
| Neem** | -- | -- | 0.00 | -- |

*El metanol fue marca Fermont® con un precio por litro de 83 pesos. **El neem no tiene un valor establecido ya que no es comercial.

Cuadro 6. Efecto de los extractos vegetales de diferentes especies y con diversas combinaciones de metanol y agua, sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* †Letras iguales no indican diferencias significativas. Tukey (P=0.05%)

| EXTRACTO | TRATAMIENTO Metanol-Agua (v/v) | EFFECTIVIDAD (%) |
|--------------|-----------------------------------|---------------------|
| Ajo | 100:0 | 100.0 a |
| | 70:30 | 100.0 a |
| | 50:50 | 100.0 a |
| | 30:70 | 100.0 a |
| | 0:100 | 90.93 a |
| Brócoli | 100:0 | 94.73 a |
| | 70:30 | 73.08 b |
| | 50:50 | 45.89 c |
| | 30:70 | 38.92 c |
| | 0:100 | 9.38 d |
| Neem | 100:0 | 100.0 a |
| | 70:30 | 100.0 a |
| | 50:50 | 98.17 a |
| | 30:70 | 100.0 a |
| | 0:100 | 100.0 a |
| Zacate Limón | 100:0 | 100.0 a |
| | 70:30 | 100.0 a |
| | 50:50 | 69.12 b |
| | 30:70 | 64.90 b |
| | 0:100 | 05.27 d |

3.6.4. Determinación de la Concentración Letal Media (CL50)

3.6.4.1. Extracto crudo de diente de Ajo

El modelo de regresión lineal encontrado fue estadísticamente significativo ($P=0.039$) y mostró un coeficiente de determinación aceptable ($r^2=0.88$). Este modelo de regresión permitió predecir el crecimiento de *C. gloeosporioides* a partir de la dosis de extracto crudo de ajo utilizado (Figura 7).

El modelo utilizado fue cuadrático con los siguientes coeficientes.

$$Y=102.40538-14.3393823x+0.53095364x^2$$

Donde:

Y= Área bajo la curva de crecimiento

x= Concentración en porcentaje de extracto crudo de ajo

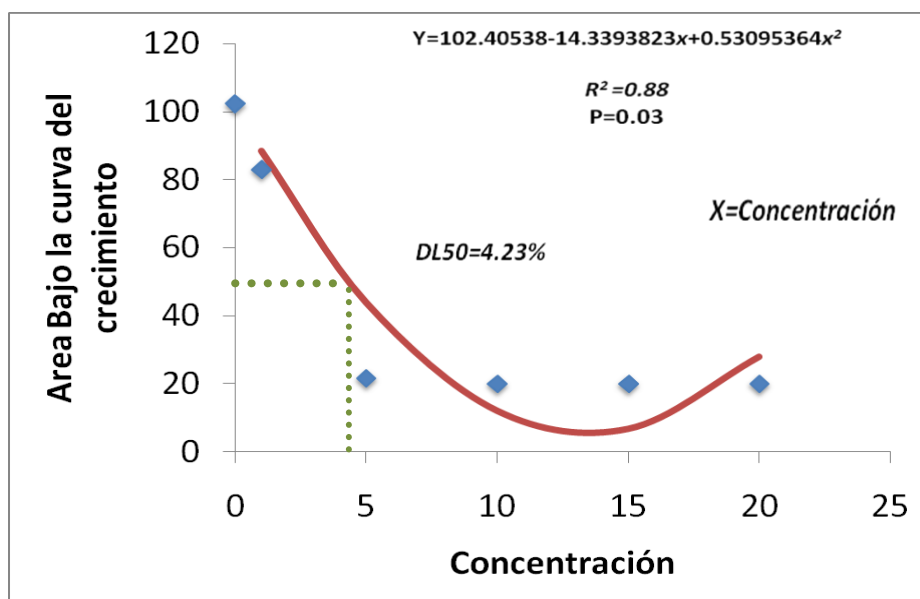


Figura 7. Modelo de regresión para determinar la DL₅₀ de extracto acuoso de diente de ajo.

El extracto acuoso de ajo, fue capaz de inhibir el crecimiento micelial del hongo en PDA. La concentración necesaria para inhibir el 50 por ciento del crecimiento micelial fue de 4.23% (Figura 8)

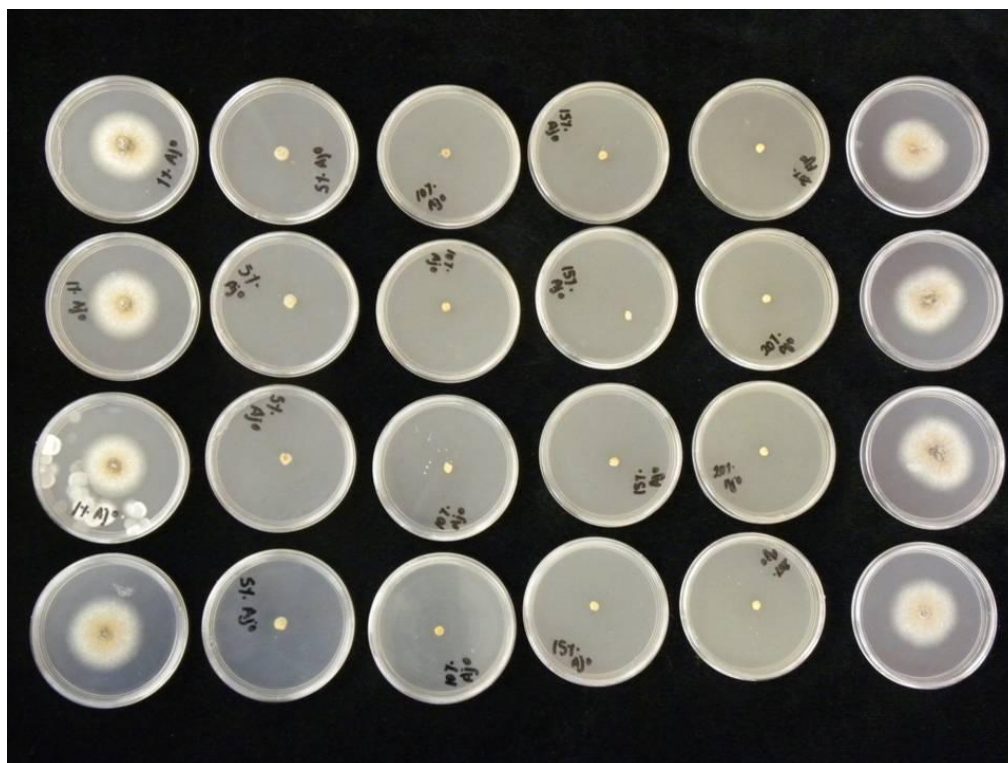


Figura 8. Evaluación de extracto acuoso de diente de ajo al 1%, 5% 10% y 15%

3.6.4.2. Extracto crudo de Zacate limón

El modelo de regresión lineal encontrado fue estadísticamente significativo ($P=0.0002$) y mostró un coeficiente de determinación aceptable ($r^2=0.99$). Este modelo de regresión permitió predecir el crecimiento de *C. gloeosporioides* a partir de la dosis de extracto de te limón utilizado (Figura 9).

El modelo utilizado fue cuadrático con los siguientes coeficientes.

$$Y=115.346878-3.85066837x-0.04420197x^2$$

Donde:

Y= Área bajo la curva de crecimiento

x= Concentración en porcentaje de extracto crudo de té limón

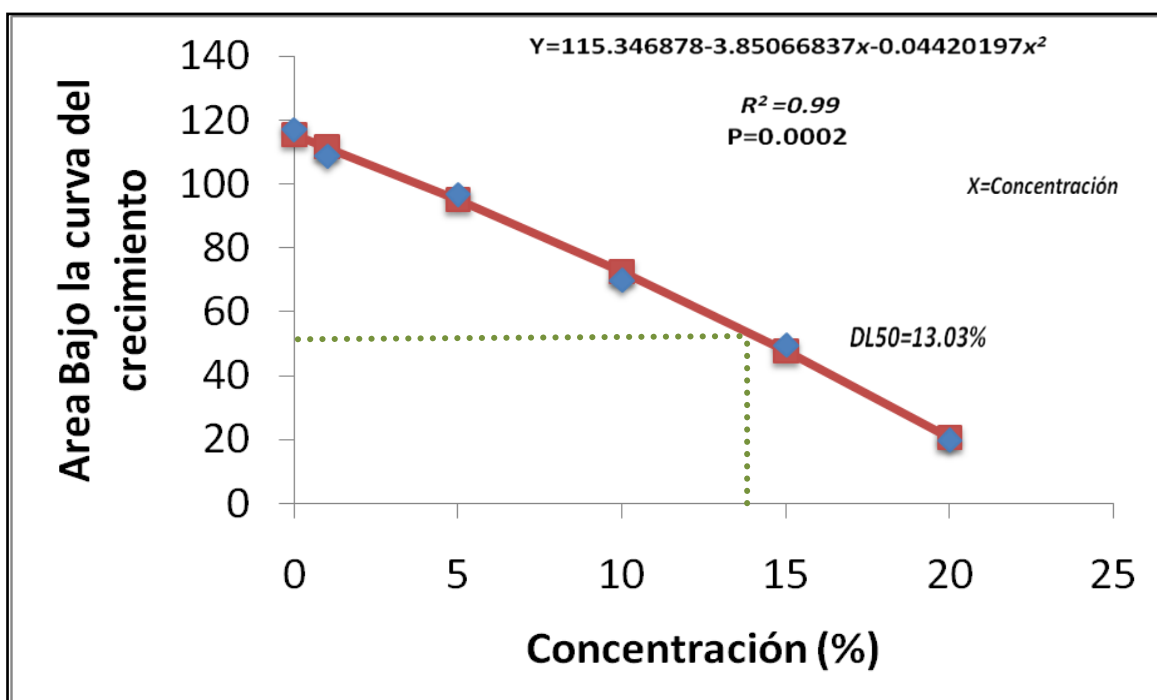


Figura 9. Modelo de regresión para determinar la DL₅₀ de extracto de hojas de té limón en una proporción metanol agua 70:30 v/v.

El extracto de zacate limón en la proporción 70:30 metanol:agua v/v, fue capaz de inhibir el crecimiento micelial del hongo en PDA. La concentración necesaria para inhibir el 50 porciento del crecimiento micelial fue de 13.03%. Esta concentración de extracto

de zacate limón fue mayor a la necesaria de Ajo (4.23%) para obtener una inhibición del 50% del crecimiento del patógeno (Figura 10).

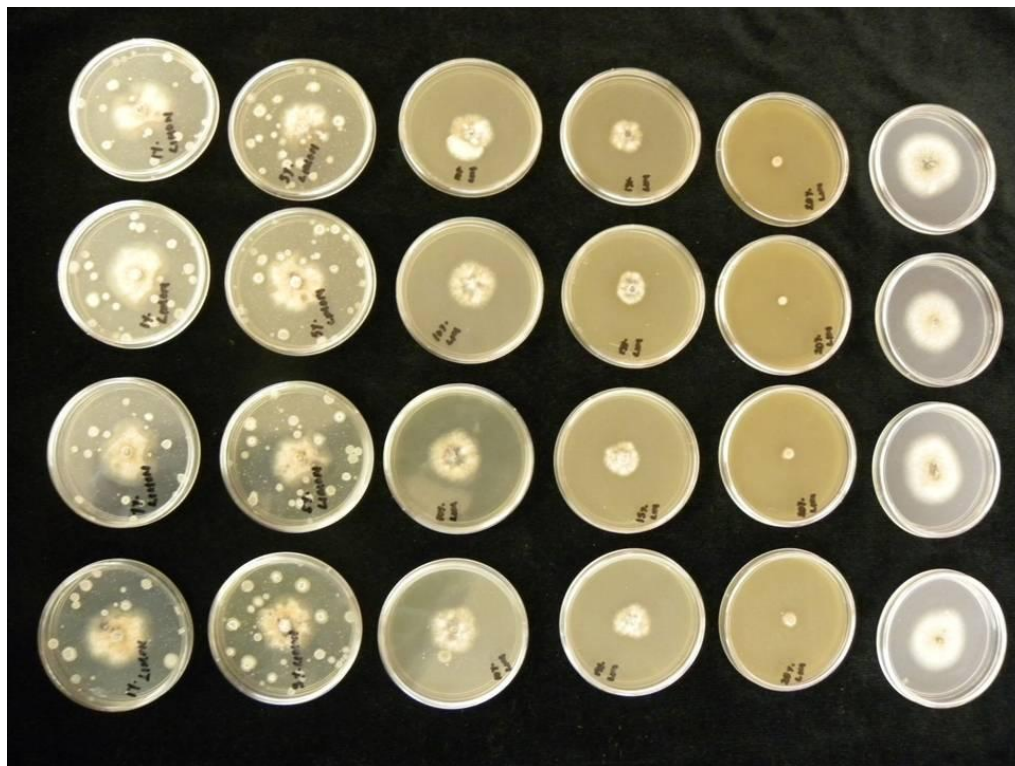


Figura 10. Evaluación de extracto de zacate limón al 1%, 5% 10% y 15%

Por otro lado el extracto de zacate limón resulto ser más caro en relación con el extracto de ajo. A pesar de que el precio del ajo es más alto que el del té limón, el extracto de ajo ofrece la ventaja de que la inhibición del patógeno se logra en extracto acuoso o metanolico. El extracto acuoso ofrece la ventaja de reducir significativamente los costos y en el caso del ajo mantiene su efectividad en contra de *C. gloeosporioides*, por otro lado para que el extracto de zacate limón muestre una efectividad aceptable se requieren de volúmenes de metanol más altos y por lo tanto el costo se aumenta.

3.7. CONCLUSIONES

Todos los extractos ensayados en el presente trabajo, mostraron un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*, sin embargo la proporción de metanol y agua fue importante para que esta efectividad se incrementara o disminuyera en el caso de algunos extractos (brócoli y zacate limón).

El extracto de ajo mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides*, sin importar la proporción de metanol y agua que se utilice, esto contribuyó a disminuir de manera significativa el costo del extracto, aun a pesar de que el costo del ajo es mayor que el de las demás plantas utilizadas. El ajo y zacate limón son los mejores extractos, por su efectividad y menor costo.

Los resultados mostraron que la CL_{50} para el extracto de ajo en una proporción metanol: agua 0:100 fue de 4.23%, mientras que la CL_{50} para el extracto de zacate limón en una proporción metanol: agua 70:30 fue de 13.03%

3.8. LITERATURA CITADA

- Abbott W S (1925)** A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ Entomol. 18:267-267.
- Agostini J P, L W Timmer, D J Mitchell (1992)** Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Phytopathology 82:1377-1382.
- Agrios G N (2005)** Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier academic press pp:922
- Amadioha A C (2004)** Control of black rot of potato caused by rhizoctonia bataticola using some plant leaf extracts. archives of phytopathology and plant protection. 37:111–117.
- Amorim A C L, M G Cardoso, J E P Pinto, P E De Souza, N D Filho (2004)** Fungitoxic activity evaluation of the hexane and methanol extracts of copaiba plant leaves *Copaifera langsdorffi* Desfon. Ciência e Agrotecnologia 28: 316-324.
- Barnett H L, B B Hunter (1998)** Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta edición. Minnesota. APS Press.218 p.
- Cano J, J Guarro, J Gené (2004)** Molecular and Morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. Journal of Clinical Microbiology 42:2450-2454.
- Droby S (2000)** Biologically and physically-based methods for the control of postharvest decay of fruits. XVI Congresso Brasileiro de Fruticultura. Brasil. pp:182-201.
- Gutiérrez A J G, A O Gutiérrez, A D Nieto, O D Téliz, M E Zavaleta, S F Delgadillo, H H Vaquera (2003)** Evaluación de resistencia a imazlil, prochloraz y

azoxystrobin en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. Y control de la antracnosis del mango (*Magnifera indica* L.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21:379-383.

Harbone J B (1973) Phytochemical methods. 2 ed. Chapman and hall editores. pp:208.

Liengme B V (2002) A guide to Microsoft Excel for scientists and engineers. (2 ed.). Butterworth- Heinemann. 271p.

Manandhar J B, G L Hartman, T C Wang (1995) Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum capsici* y *C. gloeosporioides* isolates from pepper. Plant Disease 79:361-366

Millán C (2008) Las plantas: una opción saludable para el control de plagas. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina. Uruguay. pp:110.

Nuckles E M, J Kuc (1988) Induced resistance to anthracnose in cucumber. *In*: A. B A M Baudoin. (eds.) Laboratory exercises in plant pathology: an instructional kit. The American Phytopathology Society, St. Paul. pp:16-18.

Prusky D, J McEvoy, R Leverentz, W Conway (2001) Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. Phytopathology 9:1105-1113

Rondón O, N A Sanabrá, A Rondón (2006) Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* penz, en frutos de mango. Agronomía Trop. 56: 219-235.

Sutton B C (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In:
Colletotrichum: biology, pathology and control. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds.).
CAB International. Wallingford, U.K. pp:1-26