

Caracterización mediante polimorfismo del ADN amplificado al azar de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos en frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass procedentes de zonas agroecológicas de Michoacán, México

Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolates obtained from avocado (*Persea americana* Mill.) fruits cv. Hass from different producing regions of Michoacán, Mexico using Random Amplified Polymorphic DNA

José Luciano MORALES GARCÍA¹, María del Pilar RODRÍGUEZ GUZMÁN², Hilda Susana AZPÍROZ RIVERO³ y Martha Elena PEDRAZA SANTOS¹

¹Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México, ²Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Especialidad en Fitopatología. 56230, Montecillo, Texcoco, México y ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Valle de México. km 18,5 Carretera Los Reyes-Lechería, Chapingo, Texcoco, México. E-mails: jluciano@umich.mx y jluciano@prodigy.net.mx ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 31/01/2009
Primera revisión recibida: 20/08/2009

Fin de primer arbitraje: 20/03/2009
Aceptado: 21/08/2009

RESUMEN

El síntoma de antracnosis del aguacate, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, aparece con variaciones en los municipios de Michoacán. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar aislamientos monoconidiales de *C. gloeosporioides*, obtenidos de frutos de aguacate con síntomas diversos de antracnosis y procedentes de diferentes regiones productoras de Michoacán, utilizando sus huellas genómicas producidas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a través del polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD). La distancia genética más pequeña se observó entre los monoconidiales 30 y 33 de la localidad de Uruapan con síntomas de antracnosis y antracnosis con coartadura. Las distancias más grandes se observaron entre 11 y 17 procedentes de Tacámbaro y producen síntomas de antracnosis con coartaduras y viruela respectivamente. El análisis de agrupamiento muestra grupos que se forman con base a localidades y síntomas.

Palabras claves: Aguacate, antracnosis, *Colletotrichum*, RAPD, PCR.

ABSTRACT

Avocado anthracnose by *C. gloeosporioides* is present under several variations in all the counties of Michoacan, Mexico where avocado is cultivated. The objective of the present research was to characterize monoconidial isolations of *C. gloeosporioides*, obtained from avocado fruits with different symptoms and coming from different producing regions of Michoacan, using their genomic tracks produced by the polymerization chain reaction technique through the random amplified polymorphism of ADN (RAPD). The smallest genetic distance was observed among the monoconidial isolates 30 and 33 from Uruapan fruit with anthracnoses and crack-anthracnoses symptom. The longest distances were observed among the isolates 11 and 17 are from Tacámbaro producing crack-anthracnoses and smallpox symptoms respectively. Group seems to indicate that groups are formed based on the localities and symptoms.

Key words: Avocado, anthracnoses, *Colletotrichum*, RAPD, PCR.

INTRODUCTION

México es el principal productor de aguacate (*Persea americana* Mill.) en el mundo, aportando cerca de 1.100.000 t en aproximadamente 124.829 ha, que corresponden al 52% de la producción mundial. Michoacán participa con 84.6% de 753.801 ton

producidas a nivel nacional de las cuales exportó 42.307 ton en 1998-1999.

Entre los factores fitopatológicos que más limitan la exportación, se encuentran la antracnosis y roña (USDA, 1997; Lázaro, 1985 y Téliz, 1999). *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causa la antracnosis en una amplia gama de hospedantes. Se

han reportado severas pérdidas en cultivos como: aguacate, berenjena, uva, mango, entre otros (Mills *et al.*, 1992). La antracnosis se encuentra distribuida en todos los municipios donde se cultiva aguacate, el hongo afecta al fruto en cualquier etapa de su desarrollo, traslado, almacenaje y comercialización. Una humedad relativa de 85-90%, temperatura de 18-25 °C en campo, y la falta de aereación en los huertos favorecen la infección. El hongo sobrevive en brotes tiernos, frutos momificados, ramas y hojas afectadas. La infección más severa se presenta durante los meses de junio, julio y agosto que es cuando se presenta la época de lluvias y en menor grado en febrero y marzo cuando se presentan lluvias ocasionales llamadas “cabañuelas”.

Los municipios con mayor incidencia son: Tacámbaro 74%, Tingüindín 67%, Uruapan 57%, Peribán 50% y Ziracuaretiro 42 % (Morales, 1996). La disponibilidad de un método confiable, sensitivo y rápido para la detección temprana de *C. gloeosporioides* podría facilitar los estudios epidemiológicos y la implementación de medidas de control apropiadas; sin embargo, los síntomas de la enfermedad en hoja son difíciles de diagnosticar, necesiéndose la identificación del patógeno mediante características culturales y microscópicas de aislamientos de tejido enfermo (Mills *et al.*, 1992). La caracterización molecular para diferenciar aislamientos monoconidiales de *C. gloeosporioides* sobre la base de sus huellas genómicas, es una herramienta adicional que ayuda a su identificación precisa, basada en un análisis directo del ADN, dando así algunas ventajas sobre los métodos tradicionales, que se ven influenciados por las condiciones ambientales. En la década de los 90's la amplificación del ADN mediante la técnica de la PCR (Polimerase Chain Reaction), conjuntamente con la técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN) permiten la generación de huellas genómicas, y constituyen una herramienta adicional para la caracterización, diferenciación, y separación de aislamientos de hongos fitopatógenos. *C. gloeosporioides* es considerado como un patógeno con alta variabilidad genética (Sutton, 1992). El análisis mediante RFLP de ADN mitocondrial y nuclear reveló extensa variación entre aislamientos de *C. gloeosporioides* provenientes del mismo y de diferentes hospedantes (Braithwaite *et al.* 1990). No obstante que el uso de RFLP se aplica ampliamente, este involucra un proceso minucioso y estricto de muestras de ADN. La PCR es una técnica rápida y con un requerimiento mínimo de moléculas de ADN,

debido a que fragmentos de ADN del patógeno pueden ser amplificados usando iniciadores (primers) de oligonucleótidos definidos (Mills, *et al.* 1992).

La diversidad en el tipo de síntomas que *C. gloeosporioides* causa en el fruto de aguacate como; antracnosis, antracnosis con coartaduras, viruela y manchas superficiales puede deberse a la variación genética del hongo o a la influencia de las condiciones climáticas. El uso de técnicas como la de RAPD permite un análisis preciso y confiable de las variaciones genéticas del patógeno. Los diferentes aislamientos de *C. gloeosporioides* poseen secuencias de ADN diferentes por lo que el uso de iniciadores decámeros puede producir huellas genómicas diferenciales por medio de RAPD y con ello permitir estudios de caracterización de germoplasma y detección de variabilidad genética (Bailey y Jeger, 1992). La caracterización e identificación de hongos fitopatógenos se ha basado tradicionalmente en características morfológicas, culturales, y patogénicas. Debe considerarse que estas técnicas no siempre son confiables debido a que el ambiente influye en su manifestación; sin embargo, recientemente se han desarrollado otros métodos complementarios de laboratorio con resultados muy prometedores, uno de ellos es la identificación de isoenzimas específicas (Morales, 1996). Otras son las técnicas moleculares basadas en el manejo del ADN, como la amplificación de fragmentos por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que usa moléculas arbitrarias conocidas como iniciadores. Los productos del ADN amplificado al azar se conocen como RAPD (Williams *et al.*, 1990). La bondad de estas técnicas es la simplicidad y rapidez para detectar extenso polimorfismo, así como el requerimiento de cantidades pequeñas de ADN genómico, usualmente expresados en nanogramos (Hu y Quiroz, 1991).

El análisis genético de poblaciones necesita de marcadores genéticos que den clara información. Los patólogos han empleado aquellos que son relevantes en la agricultura y fácilmente disponibles, como la virulencia de los patógenos sobre un juego de plantas que contienen diferente resistencia genética o a fungicidas específicos. La relación entre fenotipos y genotipos caracterizada mediante marcadores, proporciona información sobre la estructura genética de los patógenos (Kolmer, 1991). Aunque las características de virulencia y sensibilidad a fungicidas no son de mucho peso, dan bases estimativas de la potencialidad genética en

poblaciones de patógenos (McDonald y McDermott, 1993).

El objetivo planteado en la presente investigación fue la caracterización y comparación de la diversidad genética, síntomas y origen de aislamientos de *C. gloeosporioides* mediante la técnica de RAPD.

gloeosporioides. La fase de laboratorio se realizó en el laboratorio de frutipatología del Colegio de Postgraduados en Montecillo Edo. de México y el Laboratorio de Marcadores Genéticos Moleculares ubicado en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

La presente investigación comprendió dos fases, una de campo y otra de laboratorio. La fase de campo consistió en hacer un muestreo dirigido en huertos de diferentes localidades de tres zonas agroecológicas para coleccionar frutos de aguacate cv. Hass con alguno de los síntomas producidos por *C.*

Colecta de material

Se coleccionaron frutos de aguacate cv. Hass con síntomas de antracnosis, antracnosis con cuarteaduras, manchas brillantes, y viruela, de diferentes zonas agroecológicas (Cuadro 1). Las muestras en bolsas de plástico se trasladaron al laboratorio de frutipatología del Colegio de Postgraduados.

Cuadro 1. Clase numérica de monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de frutos de aguacate cv. Hass, síntomas y lugar de aislamiento en el estado de Michoacán en 1996.

| Región | Localidad | msnm | Síntomas de monoconidiales | | | |
|--------------|-----------------|------|----------------------------|------------|---------|------------------------------|
| | | | A | AC | V | MS |
| Uruapan | Uruapan | 1675 | | 1 | | 42, 47, 48, 49 50, 51, 52 |
| | Jucutacato | 1620 | | | 4, 5 | |
| | Toreo el Alto | 1650 | 45 | | 6, 7, 8 | |
| | Tingambato | 1780 | | | 32 | 46 |
| | La col | 1350 | | 31 | 3 | |
| | La mesa | 1300 | | | 9 | |
| | San Juan Nuevo | | 30 | 34 | | |
| | El Durazno | 2270 | 2 | | 35 | |
| | Comunal | 2300 | 5 | | | |
| | Panguaro | | | 39 | 41 | |
| | Milpillas | | 4 | 33 | | |
| | Taxuri | 1695 | | 40 | | |
| | Meson | 1600 | | 43 | | |
| | El cuate | 2000 | | | 36, 37 | 26, 29 |
| | N. Zirosto | 1975 | | 25 | | |
| S. Francisco | 1635 | | | 27, 28, 53 | | |
| Tacámbaro | Tacámbaro | 1930 | | | 22, 27 | |
| | las Joyas | | | | 20 | |
| | Viñas | | | | 21 | |
| | Ario de Rosales | | | | 10 | |
| | Longaniza | | 15 | | | |
| | Potrero | | 44 | | 36 | |
| | Tarascón | 2220 | 13, 14 | 11 | 16 | 19 |
| | La Española | | | | 17 | |
| Jucucato | | | | | 12 | |

MC = Monoconidial; A = Antracnosis; AC = Antracnosis con coarteaduras; V = Viruela; MS = Manchas Superficiales

Fase de laboratorio

Las muestras se llevaron al laboratorio donde se procedió a la siembra de tejidos con síntomas de antracnosis en medio de cultivo PDA. Dos días después se aislaron los diferentes hongos con la finalidad de purificarlos. En la medida que los hongos llenaron las cajas Petri se hicieron preparaciones temporales con lactofenol azul, para posteriormente observarse al microscopio compuesto. Cuando estos aislamientos esporularon se procedió a su identificación mediante el uso de claves especializadas. De esta manera se lograron aislamientos puros de *Colletotrichum gloeosporioides*, y se procedió a obtener cultivos monoconidiales. Según el método propuesto por Morales (1996). Para la caracterización con RAPD's se usaron 20 monoconidiales los cuales presentan diferentes síntomas de la enfermedad y provienen de las regiones de Tacámbaro y Uruapan. Para tener suficiente micelio y realizar la extracción de ADN, se colocaron tres rodajas de 7 mm de diámetro de medio de cultivo con micelio de cada monoconidial en matraces que contenían 100 ml de medio PD líquido (papa dextrosa). Los matraces de cada uno de los monoconidiales se colocaron en agitación orbital por un periodo de 6 – 8 días. El contenido del matraz se vació en un embudo, al cual previamente se le colocó un papel filtro; el embudo se colocó sobre un recipiente de un litro conectado a una bomba de vacío a través de una manguera de plástico. Posteriormente la bomba se puso a funcionar alrededor de 1 minuto, tiempo suficiente para extraer todo el medio líquido.

El micelio se colocó dentro de una pequeña bolsa de malla de fibra de vidrio. Las muestras se colocaron en una hielera de unicele y se congeló con nitrógeno líquido para detener los procesos fisiológicos y bioquímicos sin causar daño y se almacenaron a -80°C para posteriormente liofilizarlos en un equipo Labconco a -51°C y un vacío de $006 \text{ vacuum} \times 10^{-3} \text{ mbar}$ durante 48 horas con la finalidad de deshidratar los tejidos por sublimación. La cámara se mantuvo a una temperatura de -55°C con un vacío ≤ 100 micrones. El micelio liofilizado se molió con un molino de café durante 10 seg. y el polvo fino (a mayor finura mayor obtención de ADN) se almacenó en tubos corning de 15 ml en el refrigerador ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). Para la extracción del ADN se usaron 50 mg de micelio molido y se procedió de acuerdo al protocolo propuesto por Raeder y Broda (1985), modificado por Sreenivasaprasad *et al.*, (1992). La cuantificación y control de calidad del

ADN se hizo por espectrofotometría de luz ultravioleta mediante absorbancia a 260 nm ($\text{DO}_{260} \text{ nm} = 50 \mu\text{g}$ de ADN genómico).

Cada reacción de 25 μl contenía: ADN, iniciador, un amortiguador, los cuatro nucleótidos, cloruro de magnesio, Taq polimerasa y agua bajo las concentraciones indicadas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Componentes y concentraciones de los componentes necesarios para efectuar una reacción de amplificación mediante la técnica de RAPD.

| Componentes | Concentración Final |
|---|---------------------|
| Templado de ADN (30 ng/ μl) | 100 ng |
| Iniciador (10 μM) | 1,5 μM |
| Buffer PCR 10 X, libre de magnesio | 1 X |
| Taq polimerasa (5 u/ μl) | 1,5 u |
| dNTPs (200 μM) | 2,0 μM |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2,5 mM |
| ddH ₂ O | 6,8 μl |

En cada uno de los tubos se colocaron 3,33 μl del templado (ADN del monoconidial) + 21,7 de la mezcla de reacción. Posteriormente se cubrió la solución de cada tubo con 25 μl de aceite mineral estéril. Se colocaron los tubos eppendorf con la muestra en el termociclador (TECHNE PHC-2) y se corrió el siguiente programa: 1 ciclo de 7 min a 94°C , 45 ciclos compuestos de 3 segmentos como sigue: 1,5 min. a 94°C , 2 min. a 30°C , 3 min. a 72°C , 1 ciclo de 7 min. a 72°C . La pendiente de temperatura fue de $48^{\circ}\text{C}/\text{min}$. con un flujo de agua de 2,65 l/min.

Análisis de los productos amplificados: Preparación del gel

Electroforesis. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1.4 % de 14 x 9 cm, el cual se colocó dentro de la cámara de electroforesis, se llenó con amortiguador TAE IX (Trisma base, acetato de sodio y EDTA) hasta que el gel estuvo aproximadamente a 4 mm de profundidad. Como marcador de peso molecular se usó el fago ϕ X174 Hae III. **Colocación de las muestras de ADN en el gel.** Cada muestra se preparó con 3 μl de amortiguador (azul de bromofenol, y xilen cianol) y 12 μl de la muestra. **Revelado** con bromuro de etidio a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{ml}$ en oscuridad con una agitación ligera y constante durante 20 minutos.

Posteriormente el gel se enjuagó con agua destilada estéril por 10 minutos y se observó exponiéndolo a la luz ultravioleta en el transiluminador. Fotografía. La información se documentó por fotografía sobre transiluminador de luz ultravioleta con cámara fotográfica reflex, con lentilla de acercamiento filtro naranja y un rollo blanco y negro.

Análisis estadístico de la variabilidad genética

Con los datos obtenidos de la identificación de cada banda por monoconidial seleccionadas en base a la claridad y nitidez de los productos amplificados, se codificó en código binario para calcular las distancias genéticas entre las cepas, mediante el programa RAPD-104 usando el estimador de Rogers (Armstrong *et al.*, 1995). Después de calcular las distancias genéticas se procedió a hacer el análisis de agrupamiento, mediante un análisis multivariado con agrupamiento completo según los métodos de SAS (1988).

Representación gráfica. Se realizó un análisis de componentes principales mediante los métodos propuestos por SAS (1988), con la finalidad de observar en el espacio la distribución de la composición genética de los monoconidiales estudiados en función de las localidades y del síntoma. **Cálculo del índice de variabilidad genética.** Con la matriz de presencia/ausencia de bandas se calculó el índice de variabilidad genética propuesto por Montero *et al.*, (1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fase de caracterización de los 20 monoconidiales MC3, MC6, MC7, MC8, MC9, MC10, MC11, MC12, MC13, MC15, MC17, MC21, MC30, MC33, MC37, MC40, MC42, MC44, MC45 y MC46 mediante RAPD se realizó usando los iniciadores OPM-10, OPL-12, OPI-16, OPD-11 y OPA-16. El patrón de bandas obtenido por cada iniciador para cada una de las cepas se observa en las figuras 1 al 5. Es importante hacer notar que con cuatro de los iniciadores algunas de las cepas no amplificaron ninguna banda, lo cual podría explicarse de dos formas: 1) que el iniciador no haya encontrado ninguna región homologa con el ADN genómico del hongo, 2) que si haya existido alguna región homologa, pero las condiciones de amplificación no fueron suficientes para amplificarlo, por ser un fragmento demasiado grande. Se puede observar que con el iniciador OPM-10, los MC 6, 7 y 8 presentan

patrones idénticos, los tres monoconidiales son de la misma localidad, Toreo el alto de Uruapan, y presentan el mismo síntoma de la enfermedad (viruela), lo mismo sucede con el 30 y 33 pero con

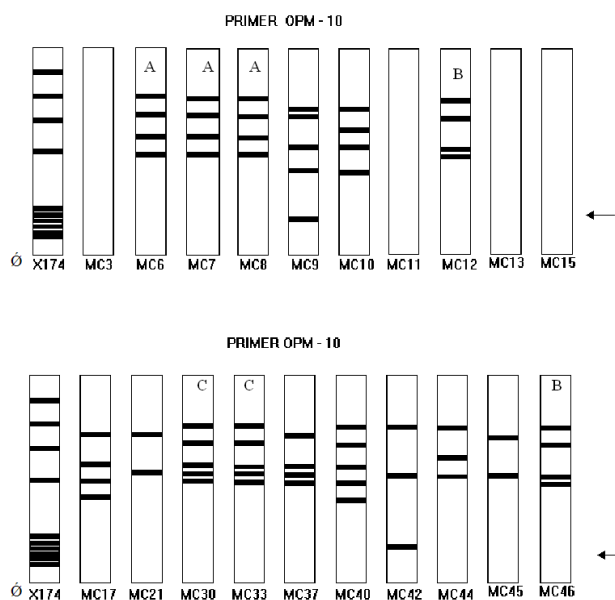


Figura 1. Patrón de bandas con el iniciador OPM – 10 de *Colletotrichum gloeosporioides*, aislados de frutos de aguacate cv “Hass” con diferente sintomatología, procedentes de varias zonas agroecológicas de Michoacán

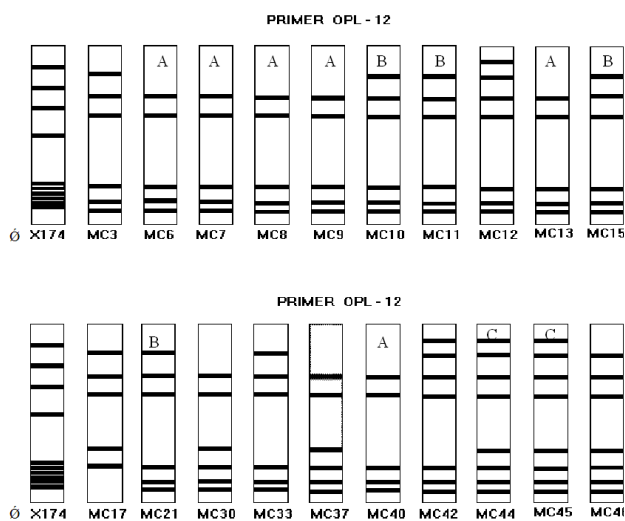


Figura 2. Patrón de bandas con el iniciador OPL – 12 de *Colletotrichum gloeosporioides*, aislados de frutos de aguacate cv "Hass" con diferentes sintomatología procedentes de varias zonas agroecológicas de Michoacán.

diferente polimorfismo a los primeros, en este caso

su origen es diferente, San Juan Nuevo y Milpillás respectivamente con la misma manifestación de la enfermedad del tipo antracnosis, los monoconidiales 12 y 46 también son idénticos en su patrón de ADN a pesar de ser de localidades diferentes, Jujucato y Tingambato pero los síntomas que manifiestan en el fruto son idénticos (manchas superficiales). El resto de los monoconidiales amplifican fragmentos de diferente peso molecular característicos a cada uno y sólo la banda de bajo peso molecular es la misma en MC 9 y 42 (Figura 1).

Con respecto al iniciador OPL-12, se revelaron fragmentos iguales en los MC 6, 7, 8, 9, 13 y 40, los tres primeros pertenecen a la misma localidad (Toreo el alto de Uruapan) y manifiestan el síntoma de viruela, el cuarto procede de la mesa y produce el mismo síntoma, en cuanto a los dos últimos el primero es del Tarascon y el segundo de Tanaxuri, ambos producen síntomas de antracnosis; por otro lado los MC 10, 11, 15 y 21 presentaron un patrón de bandeado igual y diferentes a los primeros, sin embargo entre ellos no existe ninguna relación de localidad o síntoma; otros que fueron idénticos entre ellos son el 44 y 45, ambos presentaron el síntoma de antracnosis en el fruto atacado, el resto fueron diferentes (Figura 2).

El iniciador OPI-16, reveló un patrón muy heterogéneo para la mayoría de los MC, a excepción de los MC 30 y 33 que fueron idénticos (con síntomas de antracnosis), por otro lado se observó que los MC

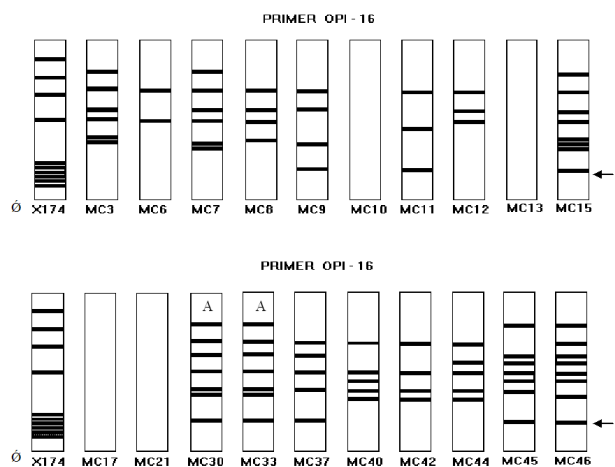


Figura 3. Patrón de bandas con el iniciador OPI – 16 de *Colletotrichum gloeosporioides*, aislados de frutos de aguacate cv “Hass” con diferentes sintomatología procedentes de varias zonas agroecológicas de Michoacán.

9, 11, 15, 30, 33, 37, 45, y 46 comparten la característica de presentar una banda de bajo peso molecular indicada por la flecha en la Figura 3.

Por otro lado el iniciador OPD-11, reveló una banda de bajo peso molecular en los MC 6, 7, 8, 10,

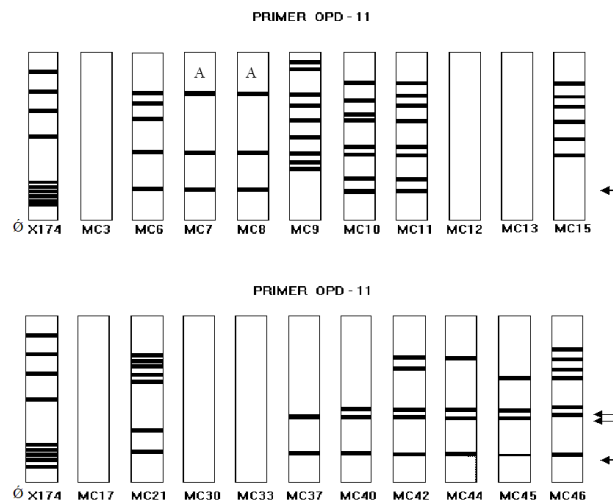


Figura 4. Patrón de bandas con el iniciador OPQ – 11 de *Colletotrichum gloeosporioides*, aislados de frutos de aguacate cv “Hass” con diferentes sintomatología procedentes de varias zonas agroecológicas de Michoacán.

11, 21, 37 40, 42, 44, 45 y 46 muy similar que la

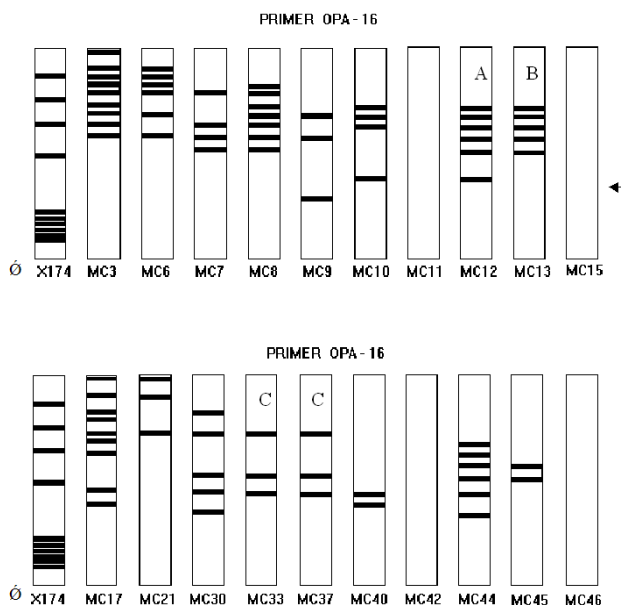


Figura 5. Patrón de bandas con el iniciador OPA – 16 de *Colletotrichum gloeosporioides*, aislados de frutos de aguacate cv “Hass” con diferentes sintomatología procedentes de varias zonas agroecológicas de Michoacán.

revelada por el iniciador OP1-16; se observa también que los únicos monoconidiales idénticos fueron el MC 7 y 8 que proceden de la misma localidad presentando ambos el síntoma de viruela en el fruto atacado, finalmente el resto fueron altamente polimórficos, aunque compartían algunas bandas iguales, como las mostradas con la doble flecha (←) (Figura 4).

Finalmente el iniciador OPA-16, fue el que mostró la mayor variación en el patrón de bandas de los monoconidiales, siendo idénticos solamente los MC 33 y 37, a pesar de proceder de sitios diferentes y manifestar síntomas contrastantes (antracnosis y viruela respectivamente) (Figura 5)

Con las frecuencias de las bandas de cada monoconidial y tomando en cuenta todos los iniciadores se calcularon las distancias genéticas, obteniéndose una matriz general, donde se observan las distancias entre los monoconidiales debida al polimorfismo de las bandas de ADN presentadas. Se encontró que la distancia más pequeña o cercanía

genética más estrecha está entre los monoconidiales MC30 y MC33 (0.091), procedentes de la región de Uruapan, el primero con síntomas de antracnosis y el segundo con síntomas de antracnosis y coartadura. La distancias más grandes se presentaron entre los monoconidiales MC15 y MC17 (0.785) ambos procedentes de la región de Tacámbaro de la localidad de Longaniza y la Española con síntomas de antracnosis con coartadura y viruela respectivamente (Cuadro 3).

En la matriz del análisis de Cluster con agrupamiento completo se encontró una desviación estándar del total de la muestra de 0.1486 (Cuadro 4), lográndose un dendrograma con dos grupos principales, uno con un solo individuo, el cual genéticamente presenta características completamente diferentes al resto. En el grupo donde está el resto de los monoconidiales se subdivide a su vez en dos subgrupos los cuales presentan una segunda subdivisión, que nos permite realizar una cierta clasificación de los monoconidiales estudiados mediante el polimorfismo de su ácido

Cuadro 3. Matriz de resultados con distancias genéticas calculadas con frecuencias de fragmentos de ADN tipo RAPD's

| | MC3 | MC6 | MC7 | MC8 | MC9 | MC10 | MC11 | MC12 | MC13 | MC15 | MC17 | MC21 | MC30 | MC33 | MC37 | MC40 | MC42 | MC44 | MC45 | MC46 | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| MC3 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MC6 | 0,395 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MC7 | 0,435 | 0,234 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MC8 | 0,318 | 0,200 | 0,208 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MC9 | 0,574 | 0,458 | 0,451 | 0,510 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MC10 | 0,581 | 0,591 | 0,574 | 0,556 | 0,542 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| MC11 | 0,568 | 0,421 | 0,463 | 0,487 | 0,542 | 0,368 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | | |
| MC12 | 0,366 | 0,429 | 0,378 | 0,256 | 0,522 | 0,476 | 0,611 | 0,000 | | | | | | | | | | | | | |
| MC13 | 0,294 | 0,486 | 0,474 | 0,278 | 0,590 | 0,543 | 0,517 | 0,273 | 0,000 | | | | | | | | | | | | |
| MC15 | 0,415 | 0,476 | 0,333 | 0,488 | 0,391 | 0,571 | 0,278 | 0,550 | 0,515 | 0,000 | | | | | | | | | | | |
| MC17 | 0,436 | 0,550 | 0,674 | 0,512 | 0,727 | 0,500 | 0,765 | 0,526 | 0,613 | 0,789 | 0,000 | | | | | | | | | | |
| MC21 | 0,550 | 0,512 | 0,545 | 0,619 | 0,511 | 0,366 | 0,429 | 0,590 | 0,625 | 0,538 | 0,514 | 0,000 | | | | | | | | | |
| MC30 | 0,455 | 0,467 | 0,417 | 0,348 | 0,592 | 0,689 | 0,641 | 0,395 | 0,444 | 0,488 | 0,561 | 0,619 | 0,000 | | | | | | | | |
| MC33 | 0,429 | 0,488 | 0,391 | 0,364 | 0,574 | 0,628 | 0,568 | 0,317 | 0,412 | 0,415 | 0,590 | 0,600 | 0,091 | 0,000 | | | | | | | |
| MC37 | 0,561 | 0,476 | 0,467 | 0,349 | 0,565 | 0,524 | 0,500 | 0,450 | 0,394 | 0,500 | 0,526 | 0,487 | 0,209 | 0,220 | 0,000 | | | | | | |
| MC40 | 0,610 | 0,381 | 0,378 | 0,349 | 0,609 | 0,524 | 0,444 | 0,450 | 0,515 | 0,500 | 0,579 | 0,692 | 0,395 | 0,366 | 0,350 | 0,000 | | | | | |
| MC42 | 0,561 | 0,429 | 0,422 | 0,442 | 0,522 | 0,476 | 0,222 | 0,450 | 0,515 | 0,300 | 0,789 | 0,487 | 0,535 | 0,463 | 0,450 | 0,350 | 0,000 | | | | |
| MC44 | 0,447 | 0,458 | 0,373 | 0,306 | 0,538 | 0,458 | 0,429 | 0,304 | 0,385 | 0,435 | 0,636 | 0,556 | 0,429 | 0,447 | 0,391 | 0,391 | 0,261 | 0,000 | | | |
| MC45 | 0,455 | 0,600 | 0,500 | 0,478 | 0,551 | 0,422 | 0,487 | 0,442 | 0,500 | 0,442 | 0,659 | 0,476 | 0,478 | 0,455 | 0,349 | 0,488 | 0,395 | 0,306 | 0,000 | | |
| MC46 | 0,532 | 0,417 | 0,333 | 0,429 | 0,462 | 0,500 | 0,381 | 0,435 | 0,641 | 0,304 | 0,727 | 0,467 | 0,347 | 0,319 | 0,391 | 0,391 | 0,304 | 0,385 | 0,265 | 0,000 | |

desoxirribonucleico, amplificado al azar (Figura 6).

En el dendrograma se observa la formación de dos grupos principales uno con el monoconidial 17 y el segundo con el resto, el cual se divide en dos subgrupos en él más pequeño de ellos tenemos predominantemente los monoconidiales de Tacámbaro con síntoma de viruela y en el otro aparecen los de Uruapan con el mismo síntoma. A pesar de que el síntoma es el mismo la conformación genética de los monoconidiales de una y otra localidad difieren, como lo indica el agrupamiento de los mismos en el dendrograma (Figura 6). En general se observa una tendencia de agrupamientos por localidad y por síntomas de la enfermedad. Con respecto a los resultados de agrupamiento por localidades concuerda con los obtenidos por Mills *et al.*, (1992). Estos resultados nos permiten de manera preliminar obtener marcadores genéticos cuya expresión fenotípica nos apoyen a agrupar variantes de *C. gloeosporioides* que pudieran influir en el manejo de la enfermedad.

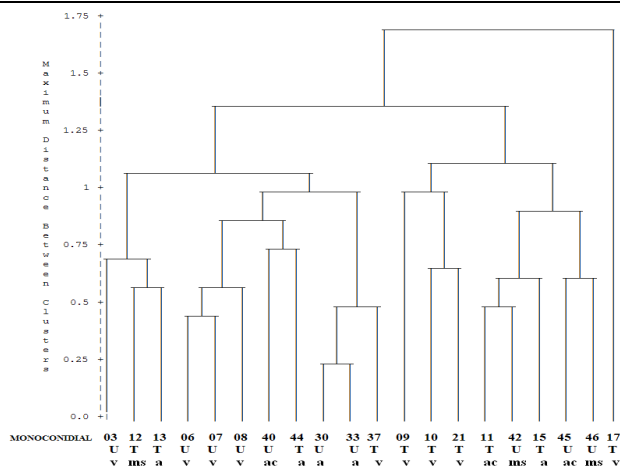


Figura 6. Dendrograma de análisis de agrupamiento completo de 20 monoconidiales aislados de frutos de aguacate cv. "Hass" en el estado de Michoacán. Los números indican los monoconidiales donde se estudió el polimorfismo del ADN amplificado al azar, las letras mayúsculas indican la localidad (U = Uruapan, T = Tacámbaro) y las minúsculas el síntoma de la enfermedad (a = antracnosis, v = viruela, ms = mancha superficial, ac = antracnosis con cuarteaduras).

Cuadro 4. Valores propios y proporción de variación explicada en el análisis multivariado de Cluster con agrupamiento completo de 20 monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de frutos de aguacate cv Hass procedentes de Tacámbaro y Uruapan, Michoacán, México y caracterizados por fragmentos de ADN amplificado al azar (RAPD's).

| Monoconidiales | Valor propio | Proporción de la Varianza | |
|----------------|--------------|---------------------------|-------------|
| | | Explicada | Acumulativo |
| 1 | 0,128201 | 0,290208 | 0,29021 |
| 2 | 0,115560 | 0,261593 | 0,55180 |
| 3 | 0,055326 | 0,125242 | 0,67704 |
| 4 | 0,039090 | 0,088487 | 0,76553 |
| 5 | 0,030726 | 0,069555 | 0,83508 |
| 6 | 0,018485 | 0,041845 | 0,87693 |
| 7 | 0,016000 | 0,036220 | 0,91315 |
| 8 | 0,012620 | 0,028567 | 0,94172 |
| 9 | 0,007487 | 0,016949 | 0,95867 |
| 10 | 0,006375 | 0,014430 | 0,97310 |
| 11 | 0,003689 | 0,008351 | 0,98145 |
| 12 | 0,002895 | 0,006553 | 0,98800 |
| 13 | 0,001633 | 0,003697 | 0,99170 |
| 14 | 0,001528 | 0,003459 | 0,99516 |
| 15 | 0,000721 | 0,001632 | 0,99679 |
| 16 | 0,000580 | 0,001313 | 0,99810 |
| 17 | 0,000479 | 0,001085 | 0,99919 |
| 18 | 0,000249 | 0,000564 | 0,99975 |
| 19 | 0,000110 | 0,000249 | 1,00000 |
| 20 | -0,000000 | -0,000000 | 1,00000 |

Desviación estándar del total de la muestra = 0,14862

Distancia media entre observaciones = 0,912096

Los valores que explican la varianza que representa cada uno de los componentes elaborados mediante los datos de distancias genéticas obtenidos a partir de la frecuencia de fragmentos de ADN de diferente longitud característicos para cada monoconidial se muestran en el cuadro 5. Los tres primeros componentes explican el 65.7 % de la variación debida a la composición genética de los monoconidiales estudiados mediante marcadores RAPD's. La distribución genética en el espacio de cada uno de los monoconidiales con base a sus distancias genéticas se muestra en la figura 7, donde se observa claramente las distancias genéticas más grandes entre los monoconidiales 15, 11, 42 y 46 (0.789, 0.765, 0.636 y 0.727 respectivamente). Se observa que el monoconidial 17 se encuentra al extremo derecho de la gráfica. Esta tendencia también se observó en el dendrograma donde el monoconidial 17 quedó aislado del resto, esto pudiera tener alguna explicación relacionada con una posible mutación de su genoma, lo cual debería de comprobarse en estudios posteriores.

En relación a su origen geográfico y síntomas que producen los monoconidiales al infectar frutos de aguacate cv. Hass, en la Figura 7 se observa que los genotipos de los monoconidiales 8, 6 y 3 cuyos síntomas es de viruela y provienen de Uruapan se

agrupan hacia la derecha. Así mismo, se forma otro grupo en el centro bajo con los monoconidiales 37,

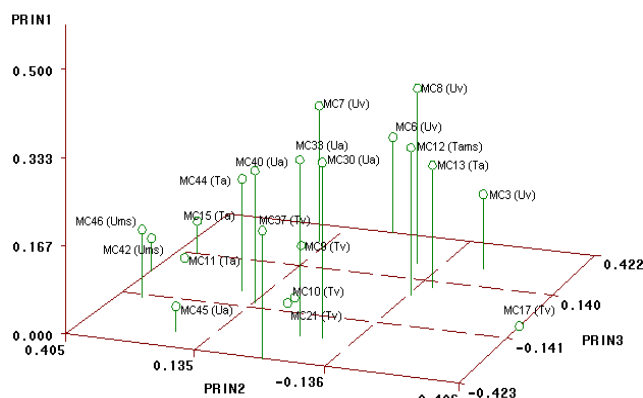


Figura 7. Representación gráfica del análisis de componentes principales de 20 monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* caracterizados por fragmentos de ADN amplificado al Azar (RAPD's. Los monoconidiales se identifican con las siglas MC más un número, los sitios geográficos por las letras mayúsculas (U = Uruapan, T = Tacámbaro) y los síntomas de la enfermedad por las minúsculas (a = antracnosis, v = viruela, ms = mancha superficial, ac = antracnosis con cuarteaduras).

Cuadro 5. Valores propios y proporción de la variación explicada por los Componentes Principales de 20 monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* caracterizados por fragmentos de ADN amplificado al azar (RAPDs)

| Componente Principal | Valor propio | Proporción de la varianza | |
|----------------------|--------------|---------------------------|-----------|
| | | Explicada | Acumulada |
| CPRIN1 | 5,74709 | 0,287354 | 0,28735 |
| CPRIN2 | 4,80019 | 0,240009 | 0,52736 |
| CPRIN3 | 2,61100 | 0,130550 | 0,65791 |
| CPRIN4 | 1,91867 | 0,095933 | 0,75385 |
| CPRIN5 | 1,44132 | 0,072066 | 0,82591 |
| CPRIN6 | 0,86479 | 0,043240 | 0,86915 |
| CPRIN7 | 0,78288 | 0,039144 | 0,90830 |
| CPRIN8 | 0,59752 | 0,029876 | 0,93817 |
| CPRIN9 | 0,37105 | 0,018553 | 0,95672 |
| CPRIN10 | 0,31164 | 0,015582 | 0,97231 |
| CPRIN11 | 0,18151 | 0,009076 | 0,98138 |
| CPRIN12 | 0,13375 | 0,006688 | 0,98807 |
| CPRIN13 | 0,07341 | 0,003671 | 0,99174 |
| CPRIN14 | 0,06865 | 0,003432 | 0,99517 |
| CPRIN15 | 0,03268 | 0,001634 | 0,99681 |
| CPRIN16 | 0,02781 | 0,001390 | 0,99820 |
| CPRIN17 | 0,02047 | 0,001024 | 0,99922 |
| CPRIN18 | 0,01100 | 0,000550 | 0,99977 |
| CPRIN19 | 0,00458 | 0,000229 | 1,00000 |
| CPRIN20 | 0,00000 | 0,000000 | 1,00000 |

21, 10 y 9 procedentes de Tacámbaro también con síntoma de viruela. A pesar de que ambos grupos producen el mismo síntoma en el fruto infectado, la composición genética de los grupos es diferente. Esto debido probablemente a las diferentes presiones ambientales y de manejo a que esta sometido *C. gloeosporioides* en las localidades, debido a que el municipio de Uruapan fue el primero donde se introdujo el aguacate cv. Hass, por lo tanto; el control químico se ha usado durante más tiempo, en contraste con Tacámbaro que es un municipio relativamente "joven", lo cual pudiera haber influido en mutaciones del hongo. En la parte central alta se observa un grupo formado con los monoconidiales 40, 33 y 30 cuya característica en cuanto a síntomas es de antracnosis y su origen es Uruapan. Por otro lado, en el extremo izquierdo se concentran los monoconidiales 44, 15 y 11 con el mismo síntoma pero provenientes de Tacámbaro, ambiente que determina la composición genética de este grupo en particular.

Finalmente en la parte mas alejada de este extremo tenemos los monoconidiales 46 y 42, con síntomas de manchas superficiales ambos de Uruapan, distantes pero genéticamente muy cercanos entre sí. Algunos monoconidiales como el 45,7, 12, 13 y 17 escapan a las tendencias señaladas, esto se debe a la necesidad de incrementar el numero de iniciadores en las pruebas de amplificación de ADN, para lograr mayor precisión en la caracterización genética de los monoconidiales en estudio.

El índice de variabilidad genética arrojó un valor de 0.4101 el cual es muy alto incluso cuando se compara con plantas superiores como el tomate de cáscara silvestre que tiene un índice de 0.3828 y maíz criollo con un valor de 0.3500 (Montero *et al.* 1998). Esta variabilidad genética tan amplia puede ser debida a la gran patogenicidad y al amplio rango de hospedantes del patógeno observado en la naturaleza. La amplia variabilidad genética encontrada concuerda con los reportado por Sutton (1992), así como lo reportado por Braithwaite (1990) mediante el análisis del ADN mitocondrial y nuclear usando la técnica de RFLP con aislamientos de *C. gloeosporioides* pero de diferente hospedante. Bailey y Jeger, (1992) reportaron una alta variación en aislamientos procedentes del mismo cultivo y del mismo país, en contraste, encontraron similitud en aislamientos procedentes de diferente cultivo (papayo y aguacate).

CONCLUSIONES

1. Las poblaciones de *Colletotrichum* son diferentes y los monoconidiales se separan de acuerdo a su lugar de procedencia y a síntomas.
2. La variabilidad genética es muy amplia, lo cual se refleja en el alto valor del índice de variabilidad genética que presentan los monoconidiales.
3. De los iniciadores ensayados OPA-16 y OPM-10 son los más eficientes para caracterizar las poblaciones de *C. gloeosporioides*.

LITERATURA CITADA

- Armstrong, J.; A. Gibb, R. Peakall and G. Weiller. 1995. The rapid distance package version 104. Australian National University, Camberra, Australia. Sitio internet <http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html>.
- Bailey, A. J. and J. M. Jeger. 1992. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. British Society for Plant Pathology. C.A.B International. 388 p.
- Braithwaite, K. S.; J. A. Irwin and J. M. Manners. 1990. Restriction fragment length polymorphisms in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes* spp. in Australia. Mycological Research 94: 1129-1137.
- Hu, J. and C. F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Rep. 10: 505-511.
- Kolmer, J. A. 1991. Evolution of distinct populations of *Puccinia recondita* f. sp *tritici* in Canadá Phytopathology 81: 316-322.
- Lázaro, B. V. 1985. Incidencia de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*, Penz) en aguacate variedad Hass almacenado en refrigeración y su relación con el manejo cultural de las huertas en Uruapan, Mich. Tesis. Ingeniero Agrícola UNAM .Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 75 p.

- Mills, P. R.; S. Sreenivasaprasad and A. E. Brown. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *Microbiology* 98: 137-144.
- McDonald, B. A. and J. M. McDermott. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. Electrophoretic markers give unprecedented precision to analyses of genetic structure of populations. *BioScience* 43:5: 311-319.
- Montero, T. V.; H. L. Montalvo, J. Morales G., R. H. Azpiroz, L. A. Peña y M. A. Gálvez. 1998. Estimación de la variabilidad genética intrapoblacional mediante el uso de fragmentos de ADN amplificados al azar. *Agric. Tec. México* 24:83-89.
- Morales G., J. L. 1996. Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate en Michoacán. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados, Montecillos, México 96 p.
- Sreenivasaprasad, S.; A. E. Brown and R. P. Mills. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 41: 265-281.
- Sutton, B. C. 1992. In: Bailey, A.J. and Jeger, J.M. 1992. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. British Society for Plant Pathology. C.A.B International. 388 p.
- Téliz, O. D. 1999. El aguacate y su manejo integrado. Mundi prensa México, S.A. de C.V. 215 p.
- United States Department of Agriculture (USDA). 1997. Docket No. 94-116-5. Final rule: Hass avocados from Mexico. *Federal Register USA*. 102 p.
- Williams, J. G. K.; A. E. Kubelik, K. L. Levak and S. C. Tingey. 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.