

Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México*

Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose in avocado Nayarit, Mexico

Eddy Trinidad-Ángel¹, Felipe de Jesús Ascencio-Valle², José Armando Ulloa^{1,3}, José Carmen Ramírez-Ramírez⁴, Juan Arturo Ragazzo-Sánchez⁵, Montserrat Calderón-Santoyo⁶ y Pedro Ulises Bautista Rosales^{1,3§}

¹Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias-Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela km 9, Xalisco, Nayarit, México. CP. 63180. Tel. 01 (311) 2118800 ext. 8962. ²Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC. Mar Bermejo núm. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, BCS, México, CP. 23090. ³Centro de Tecnología de Alimentos-Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura "Amado Nervo", Tepic, Nayarit, México, CP. 63155. ⁴Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Autónoma de Nayarit, Carretera Compostela-Chapalilla km 3.5, Compostela, Nayarit, México. CP. 63700. ⁵Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos-Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico núm. 2595, Col. Lagos del Country, Tepic, Nayarit, México. CP. 63175. [§]Autor para correspondencia: u_bautista@hotmail.com.

Resumen

La antracnosis, ocasionada por *Colletotrichum* spp., es una de las principales enfermedades del aguacate que afecta la calidad del fruto y merma su producción. En los últimos años se han reportado dificultades para la prevención y erradicación de esta enfermedad. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar cepas de *Colletotrichum* spp. como agente causal de antracnosis en el aguacate 'Hass', mediante estudios morfológicos, patogénicos y moleculares, a partir de aislamientos provenientes de las principales zonas productoras de aguacate del estado de Nayarit, México. Se recolectaron frutos con síntomas típicos de la enfermedad, colectados en cuatro ejidos pertenecientes a los municipios de Xalisco y Tepic, Nayarit, México. Se obtuvo una colección de 20 aislamientos, de los cuales 13 son de *C. gloeosporioides*, una *C. hymenocallidis*, cinco *C. siamense* y una de *C. tropicale*, siendo la más patógena el *Colletotrichum gloeosporioides*. Es importante destacar que este es el primer reporte de *C. hymenocallidis* y *C. siamense* en aguacate.

Abstract

Anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. is one of the major diseases of avocado that affects the quality of its fruit and reducing production. Difficulties in controlling and eradicating the disease have been reported in previous years. Therefore, the objective was to identify and characterize *Colletotrichum* spp. strains as causal agent of anthracnose in the 'Hass' avocado through morphological, pathogenic and molecular studies, which were isolates from the principal production zones of avocado in the state of Nayarit, Mexico. Fruits with typical disease symptoms were collected from four communal lands belonging to Xalisco and Tepic, in Nayarit, Mexico. A collection of 20 isolates was obtained, which 13 were identified as *C. gloeosporioides*, one of *C. hymenocallidis*, five of *C. siamense* and one of *C. tropicale*, where the most pathogenic was a strain of *Colletotrichum siamense* and a strain of *Colletotrichum gloeosporioides*. It is important to note that it is the first report of *C. hymenocallidis* and *C. siamense* in avocado.

Palabras clave: aguacate, diversidad, patogenicidad, variabilidad.

Introducción

El aguacate (*Persea americana*) es un fruto de importancia económica y una de las mejores opciones en la agricultura por el crecimiento de la demanda nacional y por la activación de la industria poscosecha (Guillén *et al.*, 2007). México es el principal productor y exportador de aguacate del mundo (SAGARPA, 2014). La producción anual es de 1 316 104 t, cosechadas en 130 307 ha con un rendimiento promedio de 10.1 t ha⁻¹ (SIAP, 2015).

Sin embargo, en México y en todo el mundo, la producción de este cultivo está sujeta a grandes pérdidas debido a factores bióticos y abióticos que prevalecen en las zonas del cultivo (Tamez-Guerra *et al.*, 2001). Las enfermedades de origen biótico afectan directamente al fruto y se han convertido en la mayor amenaza del comercio internacional, debido a que la fruta para exportación debe ser de la más alta calidad (Tamez-Guerra *et al.*, 2001; García *et al.*, 2013).

Dentro de estas enfermedades se encuentra la antracnosis, ocasionada por el hongo *Colletotrichum* spp., el cual es uno de los principales patógenos del aguacate 'Hass', mermando su calidad, no solo por el daño que causa al generar pudriciones directamente en la fruta, sino también porque es una limitante para la comercialización, disminuyendo el valor del producto e impidiendo la posible exportación (Ávila, 2007).

La antracnosis se caracteriza por presentar lesiones oscuras y hundidas, circulares elipsoidales, con grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosadas (Coria, 2009). La entrada del hongo al fruto puede producirse antes de la maduración y manifestar los daños cuando éste madura, fenómeno que es posible ya que la muerte celular no es una condición necesaria para la patogénesis por *Colletotrichum* spp. (Nesher *et al.*, 2008). Debido a la importancia que presenta esta enfermedad en la sanidad del fruto y que no se ha podido controlar eficientemente, se plantea como objetivo identificar y caracterizar cepas de *Colletotrichum* spp. como agente causal de antracnosis en el aguacate 'Hass', mediante

Keywords: avocado fruit, diversity, pathogenicity, variability.

Introduction

The avocado (*Persea americana*) is a fruit of economic importance and one of the best options in agriculture for the growth of national demand and for the activation of the post-harvest industry (Guillen *et al.*, 2007). Mexico is the main producer and exporter of avocado in the world (SAGARPA, 2014). The annual production is 1 316 104 t, harvested at 130 307 ha with an average yield of 10.1 t ha⁻¹ (SIAP, 2015).

However, in Mexico and around the world, crop production is subject to large losses due to biotic and abiotic factors prevailing in crop areas (Guerrero and Martínez, 2010). The biotic diseases directly affect the fruit and have become the greatest threat of international trade, because the fruit for export must be of the highest quality (Guerrero and Martínez, 2010; García *et al.*, 2013).

Among these diseases is anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum* spp., which is one of the main pathogens of 'Hass' avocado, reducing its quality, not only because of the damage caused by rotting directly on the fruit, but also because it is a limitation for the commercialization, diminishing the value of the product and preventing the possible export (Ávila, 2007).

Anthracnose is characterized by dark and sunken, ellipsoidal circular lesions, with large amounts of spores forming compact masses of salmon, orange or pink (Coria, 2009). The entry of the fungus into the fruit can occur before maturation and manifest damage when it matures, a phenomenon that is possible since cell death is not a necessary condition for the pathogenesis of *Colletotrichum* spp. (Nesher *et al.*, 2008). Due to the importance of this disease in the health of the fruit and that could not be efficiently controlled, the objective is to identify and characterize strains of *Colletotrichum* spp. as a causal agent of anthracnose in 'Hass' avocado, by morphological, pathogenic and molecular studies from isolates from the main avocado producing areas of the state of Nayarit, Mexico.

estudios morfológicos, patogénicos y moleculares a partir de aislamientos provenientes de las principales zonas productoras de aguacate del estado de Nayarit, México.

Materiales y métodos

Área de colecta

Se colectaron frutos de aguacate en huertos de los ejidos La Yerba, Camichín de Jauja y San Luis de Lozada pertenecientes al municipio de Tepic; asimismo, también se muestreó en el ejido de Xalisco que pertenece al municipio de Xalisco. En cada uno de los municipios indicados anteriormente se tomaron frutos de aguacate con signos de antracnosis directamente del árbol, los cuales se colocaron en bolsas de polietileno de baja densidad y se trasladaron al laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Nayarit.

Aislamiento y caracterización morfológica del hongo fitopatógeno.

Se lavaron los frutos, hojas y flores con agua destilada y hipoclorito de sodio al 1% para eliminar polvo y contaminantes externos, secando después con toallas de papel. Posteriormente, se hicieron cortes finos de aproximadamente 2 a 3 mm del tejido enfermo, lo que se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 3 min, enjuagando con agua destilada estéril; por último, se secaron con gasas estériles y se colocaron en cajas petri conteniendo papa dextrosa agar (PDA Dibico), se incubaron a 28 ± 3 °C, con una humedad relativa de 80%, revisando diariamente para observar el desarrollo del patógeno. Se realizaron resiembras sucesivas con PDA para purificar los cultivos del hongo fitopatógenos (Arias *et al.*, 2006; Rondón *et al.*, 2006; Santander, 2012).

La caracterización de las cepas del hongo se colocó a través de un disco de PDA con crecimiento del patógeno en una caja Petri con este mismo medio, se incubó durante 7 días a 28 ± 3 °C. Para la caracterización de las cepas se evaluó el color al frente, al reverso y del centro de la colonia, textura del micelio, forma de la colonia, tamaño y forma de conidios y el diámetro de la colonia. El diámetro de colonia se determinó midiendo con una regla milimétrica el crecimiento, obteniendo la tasa de crecimiento diario en cm, así como la diferencia del diámetro final menos el diámetro inicial (disco de micelio colocado). Se

Materials and methods

Collection area

Avocado fruits were collected in orchards of the ejidos the Yerba, Camichin de Jauja and San Luis of Lozada belonging to the municipality of Tepic; Likewise, it was also sampled in the ejido of Xalisco that belongs to the municipality of Xalisco. In each of the municipalities indicated above, avocado fruits with anthracnose signs were taken directly from the tree, which were placed in low density polyethylene bags and transferred to the Food Technology Laboratory of the Autonomous University of Nayarit.

Isolation and morphological characterization of phytopathogenic fungus.

The fruits, leaves and flowers were washed with distilled water and 1% sodium hypochlorite to remove dust and external contaminants, then dried with paper towels. Subsequently, thin sections of approximately 2 to 3 mm of the diseased tissue were made, which were disinfected with 1% sodium hypochlorite solution for 3 min, rinsing with sterile distilled water; finally dried with sterile gels and placed in petri dishes containing potato dextrose agar (PDA Dibico), incubated at 28 ± 3 °C, with a relative humidity of 80%, checking daily to observe the development of the pathogen. Successive resharpening with PDA was carried out to purify phytopathogenic fungus (Arias *et al.*, 2006; Rondón *et al.*, 2006; Santander, 2012).

The characterization of the fungus strains was placed through a PDA disk with growth of the pathogen in a Petri dish with this same medium, incubated for 7 days at 28 ± 3 °C. For the characterization of the strains, the color was evaluated at the front, back and center of the colony, mycelial texture, colony shape, conidial size and shape and colony diameter. The colony diameter was determined by measuring the growth rate with a millimeter rule, obtaining the daily growth rate in cm, as well as the difference of the final diameter minus the initial diameter (mycelial disc placed). Long and wide conidia were evaluated, which were observed by a composite microscope at a magnification of 40x and measured with a micrometric ruler. Fifty randomly selected conidia from each of the isolates were measured. The shape of the conidia was determined based on the characteristics indicated by Sutton (1992).

evaluaron largo y ancho de los conidios que fueron observados por un microscopio compuesto a una magnificación de 40x y midiendo con una reglilla micrométrica. Cincuenta conidios seleccionados al azar de cada uno de los aislamientos fueron medidos. La forma de los conidios se determinó con base en las características indicadas por Sutton (1992).

Pruebas de fitopatogenicidad

Una vez que fueron aislados los hongos del aguacate, se llevaron a cabo pruebas para determinar cuáles cepas fueron capaces de generar síntomas de enfermedad en el fruto y así comprobar la capacidad patogénica de los mismos (Benbow y Sugar, 1999).

Los aguacates libres de antracnosis se lavaron y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, enseguida se realizó un lavado con agua destilada estéril y se secó en condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar. Se realizaron 2 heridas por fruto con un punzón que permitió generar cavidades de 4 mm de diámetro por 3 mm de profundidad en diferentes zonas. Se adicionó a las heridas una alícuota de 25 μ l de la suspensión de esporas de *Colletotrichum* spp. (1×10^5 esp mL⁻¹) tomadas de un cultivo con 7 días de crecimiento. Los frutos que fueron tratados únicamente con agua destilada estéril fueron usados como control (Benbow y Sugar, 1999; Bautista, 2013). Cinco frutos fueron utilizados para cada una de las veinte cepas y cada uno de ellos se repitió tres veces.

Los aguacates tratados se colocaron en cámaras de plásticos con humedad relativa > 90%, la cual favoreció el desarrollo de estos hongos fitopatógenos. Las cámaras se mantuvieron a temperatura ambiente (28 ± 3 °C aproximadamente) durante 10 días. Se efectuaron revisiones diarias para detectar de forma oportuna la aparición de los signos de la enfermedad (lesiones necróticas) (Benbow y Sugar 1999).

Identificación molecular de los hongos fitopatógenos.

Se utilizó PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para confirmar la identificación de los aislados de *Colletotrichum*. Se realizó la extracción de ADN de los hongos patógenos mediante la técnica descrita por Sambrook y Russel (2001).

La región ITS-5.8S-ITS2 del rDNA fue amplificada mediante los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

Phytopathogenicity tests

Once the avocado fungi were isolated, tests were carried out to determine which strains were able to generate symptoms of disease in the fruit and thus to verify the pathogenic capacity of them (Benbow and Sugar, 1999).

The anthracnose free avocados were washed and disinfected with 1% sodium hypochlorite solution for 3 min, then washed with sterile distilled water and dried under asepsis conditions in a laminar flow hood. Two wounds per fruit were realized with a punch that allowed to create cavities of 4 mm of diameter by 3 mm of depth in different zones. A 25 μ l aliquot of the *Colletotrichum* spp spore suspension was added to the wounds. (1×10^5 esp mL⁻¹) taken from a culture with 7 days of growth. Fruits that were treated only with sterile distilled water were used as controls (Benbow and Sugar, 1999; Bautista, 2013). Five fruits were used for each of the twenty strains and each was repeated three times.

The treated avocados were placed in plastic chambers with relative humidity higher than 90%, which favored the development of these phytopathogenic fungi. The chambers were maintained at room temperature (28 ± 3 °C approximately) for 10 days. Daily check-ups were performed to detect, in a timely manner, the signs of the disease (necrotic lesions) (Benbow and Sugar 1999).

Molecular identification of phytopathogenic fungi.

PCR (Polymerase Chain Reaction) was used to confirm the identification of *Colletotrichum* isolates. DNA extraction from pathogenic fungi was performed using the technique described by Sambrook and Russel (2001).

The ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA was amplified by primers ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

The PCR amplifications were performed through a thermocycler (Applied Biosystem® GeneAmp® PCR System 9700, California, USA) with the following conditions: denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C per 1 min, alignment at 50 °C for 30 s and primer extension at 72 °C for 2 min. With a final extension at 72 °C for 10 min. The amplification products were separated by 1% agarose gel electrophoresis (SIGMA-Aldrich®, Germany), which were stained with methyl

Las amplificaciones por PCR se realizaron a través de un termociclador (Applied Biosystem® GeneAmp® PCR System 9700, California, EUA) con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineación a 50 °C por 30 s y una extensión del iniciador a 72 °C por 2 min. Con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA-Aldrich®, Alemania), las cuales se tiñeron con bromuro de metilo (0.2 µg mL⁻¹). Los amplicones de DNA se visualizaron en un transiluminador (BioDoc-IT system image, UVP®, EUA) (Ochoa *et al.*, 2007) y secuenciados (Genewiz Inc. New Jersey, EUA). Las secuencias de DNA fueron alineadas en Basic Local Alignment Search Tool (NCBI BLAST) de la base de datos en línea NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997).

Crecimiento del tubo germinativo y tamaño de esporas de *Colletotrichum* spp.

Para determinar el porcentaje de germinación y crecimiento del tubo germinativo de esporas de *Colletotrichum* spp. se empleó la técnica de cultivo en portaobjetos (Cai *et al.*, 2009), se tomaron cortes del cultivo en medio PDA de 10 mm² y se colocaron sobre un portaobjetos. Luego se depositaron 30 µL de una suspensión de esporas (1x10⁶ esporas. µL⁻¹) sobre los bordes del corte y se cubrió con placas cubreobjetos (Johnston y Jones, 1997). Los cultivos se incubaron durante 8 h a temperatura ambiente (28 °C) y bajo condiciones de elevada humedad en cajas plásticas con tapa (Chaky *et al.*, 2001).

Se registró la longitud y el ancho de 30 esporas y del tubo germinativo de cada aislamiento. Las observaciones y mediciones microscópicas se hicieron bajo un microscopio óptico con una magnificación de 40x. Las estructuras en cada placa se fotografiaron con el programa (Motic Images Plus 2.0), las imágenes se usaron para medir la longitud y el ancho de las esporas y el tubo germinativo del *Colletotrichum* spp. (Rodríguez *et al.*, 2009).

La evaluación de patogenicidad se realizó con 10 réplicas por cepa. Los datos obtenidos de la caracterización de cepas del hongo (tamaño del conidio= largo x ancho) y tubo germinativo, así como patogenicidad se evaluaron utilizando un diseño completamente al azar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, usando el paquete estadístico Statistic Analysis System (SAS, 2009) versión 9.

bromide (0.2 µg mL⁻¹). the DNA amplicons were visualized in a transilluminator (BioDoc-IT system image, UVP®, USA) (Ochoa *et al.*, 2007) and sequenced (Genewiz Inc. New Jersey, USA). The DNA sequences were aligned in the NCBI online database (NCBI BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997).

Growth of the germinal tube and spore size of *Colletotrichum* spp.

To determine the percentage of germination and growth of the spore germ of *Colletotrichum* spp. the technique of slide culture was used (Cai *et al.*, 2009), for which cropping was taken in PDA medium of 10 mm² and placed on a slide. The 30 µL of a spore suspension (1x10⁶ spores µL⁻¹) were then deposited on the edges of the cut and covered with coverslip plates (Johnston and Jones, 1997). The cultures were incubated for 8 hours at room temperature (28 °C) and under high humidity conditions in plastic boxes with lid (Chaky *et al.*, 2001).

The length and width of 30 spores and the germinative tube of each insulation were recorded. Microscopic observations and measurements were made under an optical microscope at a magnification of 40x. The structures on each plate were photographed with the program (Motic Images Plus 2.0), the images were used to measure the length and width of the spores and the germinal tube of *Colletotrichum* spp. (Rodríguez *et al.*, 2009).

Pathogenicity evaluation was performed with 10 replicates per strain. Data obtained from the characterization of fungus strains (conidial size = long x width) and germ tube as well as pathogenicity were evaluated using a completely randomized design. The data were subjected to a variance analysis and multiple means comparison using the Tukey test at a significance level of $p \leq 0.05$, using the statistical package Statistic Analysis System (SAS, 2009) version 9.

Results and discussion

Isolation of the pathogen and morphological characterization

A total of 86 fungal strains were isolated, among which 20 strains of *Colletotrichum* spp. using molecular techniques, which were identified as *C. gloeosporioides* (13 strains),

Resultados y discusión

Aislamiento del patógeno y la caracterización morfológica

Se aislaron un total de 86 cepas de hongos, entre las que se identificaron 20 cepas de *Colletotrichum* spp. mediante técnicas moleculares, las cuales fueron identificadas como: *C. gloeosporioides* (13 cepas), *C. hymenocallidis* (1 cepa), *C. siamense* (5 cepas) y *C. tropicale* (1 cepa) (Cuadro 1). De estas cepas, la especie *C. gloeosporioides* ha sido reportada en diferentes especies como papaya, cítricos, aguacate, café, mango, uva, guanábana, tomate y fresa (Beltrán y García, 2006). Como también el *C. tropicale* se han reportado que diversos cultivos han sido afectados, como la guanábana, mango y aguacate entre otros (Rojas *et al.*, 2010).

C. hymenocallidis (1 strain), *C. siamense* (5 strains) and *C. tropicale* (1 strain) (Table 1). From these strains, *C. gloeosporioides* has been reported in different species such as papaya, citrus varieties, avocado, coffee, mango, grape, soursop, tomato and strawberry (Beltrán and García, 2006). As well as *C. tropicale*, several crops have been reported, such as guanabana, mango and avocado among others (Rojas *et al.*, 2010).

However, the rest of the species have not been reported for avocado, as is the case of *C. hymenocallidis* which has been reported mainly in spider lily and some cases in chile and tomato (Yang *et al.*, 2009). Like *C. siamense*, the information is not available if it causes damage to the avocado, but if in the various crops such as the tree of bread, coffee tree, fig, cocoa, good herb, black pepper, rosemary (James *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Características macroscópicas de las cepas aisladas de aguacate del genero *Colletotrichum*.

Table 1. Macroscopic characteristics of avocado strains isolated from the genus *Colletotrichum*.

Cepas	Crecimiento	Color	Micelio	Masas conidiales
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ANb, ANc, ANe, ANf y ANk)	Rápido	Blanco-crema	Abundante y algodonoso	Escasas, salmón y negras, distribución concéntrica
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ANj)	Lento	Blanco-crema	Abundante, compacto y algodonoso	Escasas, salmón y negras, distribución concéntrica
<i>Colletotrichum hymenocallidis</i> (ANn)	Rápido	Blanco-crema, centro color naranja	Abundante y algodonoso	Abundante, salmón y negras, distribución aleatoria
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ANa, ANd, ANi y ANl)	Rápido	Blanco-crema centro color naranja	Abundante y superficial	Abundante, salmón y negras, distribución aleatoria
<i>Colletotrichum siamense</i> (ANo, ANp, ANq, ANr y ANs)	Rápido	Blanco-crema	Abundante, algodonoso, grueso	Escasas, salmón y negras, distribución concéntrica
<i>Colletotrichum tropicale</i> (ANT)	Rápido	Blanco-crema centro color naranja-salmón	Abundante y algodonoso	Abundante, salmón y negras, distribución concéntrica
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ANg y ANm)	Rápido	Blanco-crema centro color naranja-salmón	Abundante, grueso y algodonoso	Abundante, salmón y negras, distribución concéntrica
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ANh)	Rápido	color naranja-salmón	Abundante y grueso	Abundante, salmón y negras, distribución concéntrica

Sin embargo, el resto de las especies no han sido reportadas para el aguacate, como es el caso del *C. hymenocallidis* que ha sido reportada principalmente en lirio araña y algunos casos en chile y tomate (Yang *et al.*, 2009). Al igual que el *C. siamense* no se cuenta con la información si provoca daño al aguacate, pero si en los diversos cultivos como árbol de jaca, árbol de pan, café, higuera, cacao, yerba buena, pimienta negra, romero (James *et al.*, 2014).

Las cepas se agruparon en 8 categorías de acuerdo a sus características morfológicas macroscópicas como el tipo de crecimiento, micelio, color y masa conidial, las cuales

The strains were grouped into 8 categories according to their macroscopic morphological characteristics such as growth type, mycelia, color and conidial mass, which are presented in Table 1. All these isolates have characteristics similar to those obtained by Rodríguez *et al.* (2009) that together with Pérez *et al.* (2003) mention that the pathogen that causes antracosis called *Colletotrichum* spp. has great morphological variability due to the parameters such as incubation conditions, temperature and humidity, however, in the present work the environmental conditions or culture medium were not varied, so we can highlight the variations that may exist between species and even among strains of

se presentan en el Cuadro 1. Todos estos aislamientos presentan características similares a los obtenidos por Rodríguez *et al.* (2009) que junto a Pérez *et al.* (2003) mencionan que el patógeno causante de la antracosis llamado *Colletotrichum* spp. tiene gran variabilidad morfológica debido a los parámetros como las condiciones de incubación, temperatura y humedad, sin embargo, en el presente trabajo no se variaron las condiciones ambientales ni de medio de cultivo, por lo que podemos destacar las variaciones que puede haber entre especies e incluso entre cepas de la misma especie, que de acuerdo a Gutiérrez *et al.* (2001) puede deberse a la gran plasticidad genética de adaptación a diferentes condiciones.

Fitopatogenicidad en frutos de aguacate

Todos los aislados identificados como *Colletotrichum* causaron los síntomas de antracosis en los aguacates inoculados a partir del día seis. La prueba de patogenicidad de los diferentes aislados *Colletotrichum* spp. demostró que las 20 cepas fueron capaces de generar, a los 10 días después de la inoculación (ddi), los mismos signos de la enfermedad que se presentaron en las lesiones de las que fueron aislados (Figura 1), por lo cual, los re-aislamientos a partir de los aguacates infectados artificialmente comparten las características de las cepas que fueron inoculados, es decir, cumplen con los postulados de Koch.

En las pruebas *in vivo*, las cepas ANq (*C. siamense*) y ANc (*C. gloeosporioides*) tuvieron el mayor diámetro de desarrollo de los síntomas de la enfermedad, seguido por un grupo de cepas de *C. gloeosporioides*, *C. siamense* y de menor virulencia en aguacate se encontraron *C. hymenocallidis* y *C. tropicale*, sin embargo, todas las cepas causaron daños considerables al fruto (Figura 2).

Las 20 cepas presentan una alta variabilidad morfológica, patogénica y genética, que de acuerdo a Morales *et al.* (2009), está relacionada al lugar donde fue aislado el patógeno. En el presente trabajo, las cepas más patógenas fueron aislados de huertos donde los árboles no se podaban y tenían las condiciones de humedad y temperatura para el desarrollo de los patógenos. Montero *et al.* (2010) menciona que la variabilidad del *C. gloeosporioides* se debe a sus aspectos bioquímicos; mientras que Marroquín *et al.* (2016) comenta que existe una gran variabilidad patogénica, lo cual hace que las reacciones diferenciales expresadas en las interacciones de *Colletotrichum gloeosporioides* sean diferentes.

the same species, which according to Gutiérrez *et al.* (2001) may be due to the great genetic plasticity of adaptation to different conditions.

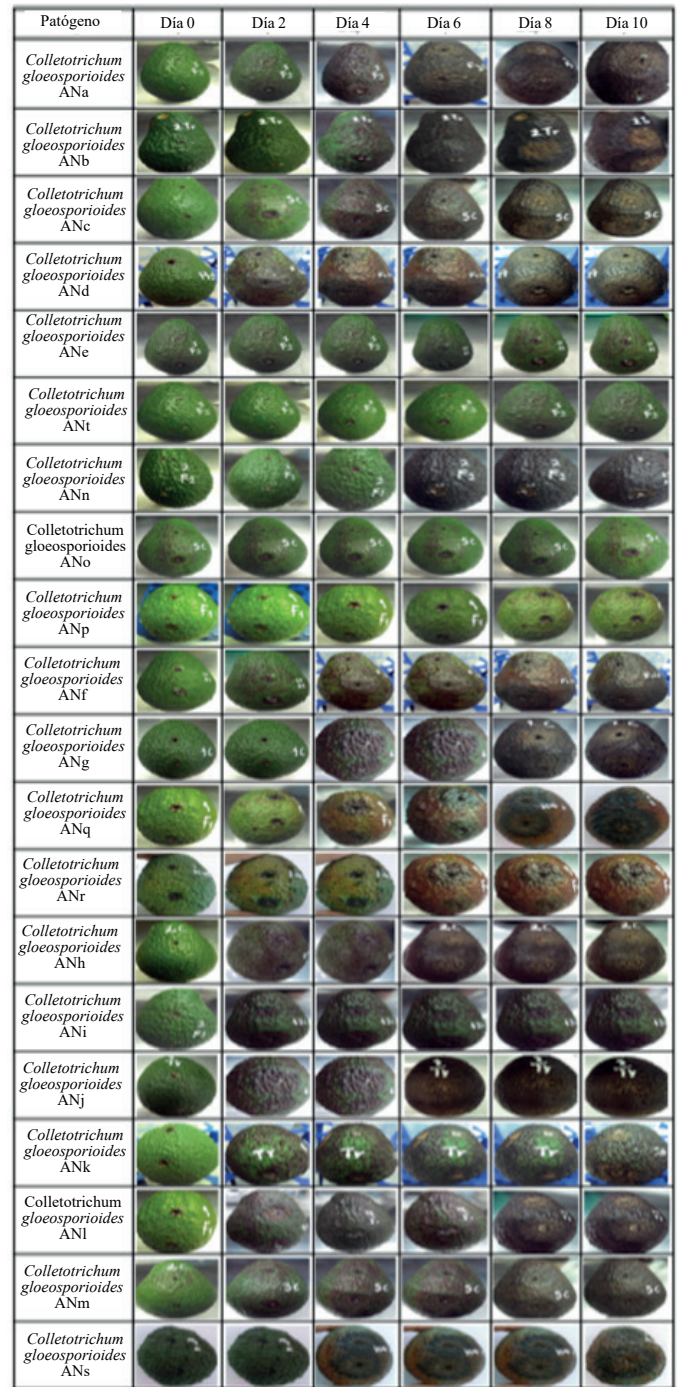


Figura 1. Daño causado por *Colletotrichum* spp. en el aguacate ‘Hass’ durante 10 días de incubación.
Figure 1. Damage caused by *Colletotrichum* spp. in the avocado ‘Hass’ during 10 days of incubation.

de *Colletotrichum* fueron clasificados en cuatro grupos principales con referencia al desarrollo del tubo germinativo durante ocho horas (Figura 3). El primer grupo está integrado por la cepa NAa, la cual presentó un crecimiento de 102.9 μm ; el segundo grupo por la cepa NAc (71.6 μm), el tercer grupo por las cepas NAd, NAb, NAf, NAj, NAM, Nag, NAT, NAh, Nai, NAn, NAr, NAq, NAK, y NAs (46.1-22.5 μm), mientras que el cuarto grupo está integrado por las cepas NAl, NAe, NAp y Nao (20.5-9.2 μm). El crecimiento del tubo germinativo más alto a las 8 horas después de la siembra lo presentó *Colletotrichum gloeosporioides*.

En relación al tamaño de la espora, se encontró que existe variabilidad tanto en lo largo como en lo ancho de la espora, con un largo entre 14.8 y 33.9 μm , mientras que a lo ancho se tiene un rango que va de 5.2 μm a 8.6 μm .

En el cuadro 2 se presenta el coeficiente de correlación de Pearson entre las características morfológicas de las esporas y el desarrollo del patógeno, donde se muestra que no hay correlación significativa en el tamaño de la espora y el desarrollo de los hongos *in vivo* o *in vitro* ($p \leq 0.05$); sin embargo, el crecimiento del tubo germinativo presenta una correlación significativa con el desarrollo del patógeno *in vitro* e *in vivo*, con un R^2 de 0.548 y 0.552 respectivamente ($p \leq 0.05$).

Cuadro 2. Correlación de la morfología de las esporas y el desarrollo del patógeno.
Table 2. Correlation of spore morphology and pathogen development.

	Largo de espora	Ancho de espora	Desarrollo <i>in vitro</i>	Desarrollo <i>in vivo</i>	T. germinativo
Largo de espora	1	0.042	-0.357	-0.191	-0.189
Ancho de espora	0.042	1	-0.178	-0.325	-0.158
Desarrollo <i>in vitro</i>	-0.357	-0.178	1	0.946**	0.548*
Desarrollo <i>in vivo</i>	-0.191	-0.325	0.946**	1	0.552*
T. germinativo	-0.189	-0.158	0.548*	0.552*	1

*= correlación es significativa al nivel de 0.05; **= correlación es significativa al nivel de 0.01.

Rodríguez *et al.* (2013) mencionan que no se necesita el desarrollo del apresorio para poder hacer daño al hospedero, pero si depende de la germinación y al desarrollo del tubo germinativo para poder formar la síntesis de una capa mucilaginosa que se adhiere al hospedero; al igual Cascino *et al.* (1990) y Kim *et al.* (1999) mencionan que no todas las especies de *Colletotrichum* forman apresorio, sino que pueden penetrar directamente con ayuda del tubo germinativo.

maturation of the fruit the levels of this compound and others that are antifungal decrease, which causes the activation of the fungus (Benito and Prusky 2000 *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2013), which is consistent with what was observed in the present study.

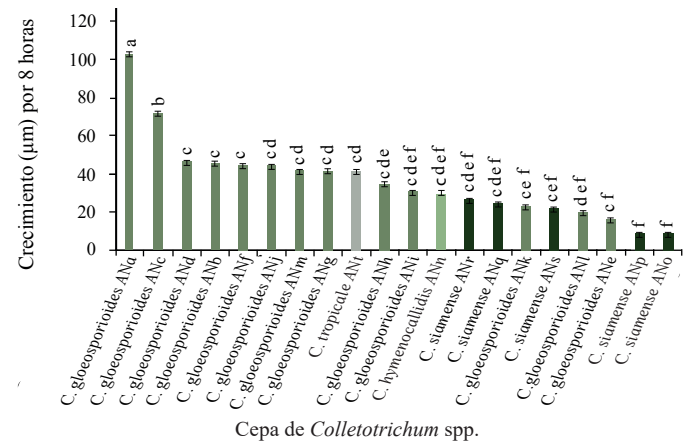


Figura 3. Desarrollo del tubo germinativo de 20 cepas de *Colletotrichum* spp. aisladas del cultivo de aguacate a 8 h después de la inoculación.

Figure 3. Development of the germinal tube of 20 strains of *Colletotrichum* spp. isolated from the avocado crop at 8 h after inoculation.

Growth of the germinal tube and spore size of *Colletotrichum* spp.

According to studies by Adaskaveg and Hartin (1997), morphology is a characteristic that can vary according to the isolate. In the present study, *Colletotrichum* strains were classified into four major groups with reference to germ tube development for eight hours (Figure 3). The first group consists of the NAa strain, which presented a growth

Los resultados en este estudio claramente muestran que hay al menos cuatro especies de *Colletotrichum* patógenas de aguacate, estas especies presentan diversidad morfológica y patogénica incluso entre cepas de la misma especie.

Conclusión

En el presente estudio se lograron identificar 20 cepas de *Colletotrichum*, encontrándose las especies *C. gloeosporioides*, *C. hymenocallidis*, *C. siamense* y *C. tropicale*, las cuales presentaron diferente grado de patogénesis en el fruto de aguacate.

Se encontró variabilidad morfológica tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico. El crecimiento del tubo germinativo esta correlacionado con el desarrollo del patógeno.

Agradecimientos

ACONACYT por otorgar la beca de maestría del estudiante Eddy Trinidad Ángel, a PRODEP por financiar el proyecto apoyo a la incorporación de NPTC y al Consejo Nayarita del Aguacate, AC. por facilitar la entrada a los huertos y los frutos.

Literatura citada

- Adaskaveg, J. E. and Hartin, R. J. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Am. Phytopathol. Soc.* 87 pp.
- Alarcón, R. J. J. y Chavarriaga, M. W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz & Sacc. En tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agronomía.* 15(1):89-102
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Arias, R. B.; Yáñez, V.; Carrizales L. y Sánchez, M. 2006. Hongos asociados a la caída prematura de frutos en lima persa (*Citrus latifolia*) y evaluación de su control químico. *Bioagro* 18(1):31-39.
- Ávila, Q. G.; Silva, R. H. and Téliz, O. D. 2007. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. *Plant Dis.* 91(9):1200-1213.

of 102.9 μm ; the second group by the strain NAc (71.6 μm), the third group by the strains NAd, NAb, NAf, NAj, NAm, Nag, NAt, NAh, Nai, NAn, NAr, NAq, NAK, and NAs (46.1-22.5 μm), while the fourth group is composed of strains NAl, NAe, NAp and Nao (20.5-9.2 μm). Growth of the highest germination tube at 8 hours after sowing was reported by *Colletotrichum gloeosporioides*.

In relation to the size of the spore, it was found that there is variability both in the length and the width of the spore, with a length between 14.8 and 33.9 μm , whereas in the width one has a range that goes from 5.2 μm to 8.6 μm .

In the Table 2 presents the Pearson correlation coefficient between the morphological characteristics of the spores and the development of the pathogen, where it is shown that there is no statistically significant correlation between the spore size and the development of the fungi, either *in vivo* or *in vitro* ($p \leq 0.05$); however, germ tube growth has a statistically significant correlation with *in vitro* and *in vivo* pathogen development, with a Pearson r of 0.548 and 0.552 respectively ($p \leq 0.05$).

Rodríguez *et al.* (2013) mention that the development of the appressorium is not necessary to be able to do damage to the host, but depends on the germination and the development of the germinative tube to be able to form the synthesis of a mucilaginous layer that adheres to the host; as well as Cascino *et al.* (1990) and Kim *et al.* (1999) mention that not all species of *Colletotrichum* form appressorium, but can penetrate directly with the help of the germinative tube.

The results in this study clearly show that there are at least four species of avocado pathogenic *Colletotrichum*; these species present morphological and pathogenic diversity even among strains of the same species.

Conclusion

In the present study, 20 strains of *Colletotrichum* were identified, with the species *C. gloeosporioides*, *C. hymenocallidis*, *C. siamense* and *C. tropicale*, which presented a different degree of pathogenesis in the avocado fruit.

- Bautista, R. P. U.; Calderón, S. M.; Servín, V. R.; Ochoa, A. N. A. and Ragazzo, S. J. A. 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological Control* 65(3):293-301.
- Beltrán, M. C. y García, D. J. 2006. *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. *Investigaciones Andinas*. 8(13):73-80.
- Benbow, J. M. and Sugar, D. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast application. *Plant Dis.* 83(9):839-844.
- Beno, D. B. and Prusky, D. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology*. 90(5):553-559.
- Cai, L.; Hyde, K. D.; Taylor, P. W. J.; Weir, B. S.; Waller, J.; Abang, M. M.; Zhang, J. Z.; Yang, Y. L.; Phoulivong, S.; Liu, Z. Y.; Prihastuti, H.; Shivas, R. G.; McKenzie, E. H. C. and Johnston, P. R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39(1):183-204.
- Cascino, J. J.; Harris, R. F.; Smith, C. S. and Andrews, J. H. 1990. Spore yield and microcycle conidiation of *Colletotrichum gloeosporioides* in liquid culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2303-2310 pp.
- Chaky, J.; Anderson, K.; Moss, M. and Vaillancourt, L. 2001. Surface hydrophobicity and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*. 91(6):558-564.
- Coria, A. V. M. 2009. Tecnología para la producción de aguacate en México. 2^{da}. (Ed.). Secretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Uruapan, Michoacán, México 222 p.
- Domínguez, P.; Mohali, S. R.; Marín, M. A. y Pino, H. B. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de pal aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. *Tropical Plant Pathol.* 37(2):108-122.
- García, J.; Morales, L. L. J.; Mendoza, A. R. M.; Coria, M. M. V.; Aguirre, P. L. J.; Sánchez, F. J. L.; Vidales, V. A. J.; Tapia, R. M. L.; Hernández, R. G. y Alcántar, J. J. 2013. Tecnología Produce Aguacate en Michoacán. COFUPRO. 1-32 p.
- Guestsky, R.; Kobiler, I.; Wang, X.; Perlman, N.; Gollop, N.; Ávila, Q. G.; Hadar, I. and Prusky, D. 2005. Metabolism of the flavonoid epicatechin by lacassa of *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on pathogenicity on avocado fruit. *Phytopathology*. 95(11):1341-1348.
- Gutiérrez, A. J. G.; Nieto, A. D.; Téliz, O. D.; Zavaleta, M. E.; Vaquera, H. H.; Matínez, D. T. y Delgadillo, S. F. 2001. Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). *Rev. Mex. Fitopatol.* 19(1):90-93.
- Guillén, A. H.; Lara, B. N.; Gutiérrez, M.; Ortíz, M. y Ángel, E. 2007. Cartografía agroecológica del cultivo del aguacate en Michoacán. Morevallado (Ed.) de Morelia, Michoacán México 141 p.
- James, R. S.; Ray, J.; Tan, Y. P. and Shivas, R. G. 2014. *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Dis.* 9(138):1-6.
- Morphological variability was found at both macroscopic and microscopic levels. Growth of the germ tube is correlated with the development of the pathogen.

End of the English version



- Johnston, P. R. and Jones, D. 1997. Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*. 89(3): 420-430.
- Kim, K. D.; Oh, B. J. and Yang, J. 1999. Differential Interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica*. 27(2):97-106.
- Marroquín, N. G.; Bustamante, S. L.; Pinzón, Y. A. y Buitrago, G. 2016. Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de plantas de ñame de la Costa Atlántica Colombiana utilizando la técnica "DNA Amplification Fingerprinting (DAF)". *Rev. Colomb. Biotecnol.* 18(1):95-103.
- Montero, V.; Morales, J. L.; González, M. M.; Anaya, J. L.; Corona, T. y Gálvez, A. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 1(2):159-174.
- Morales, J. L.; Azpíroz, H. S. y Pedraza, M. E. 2009. Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Michoacán, México. *Rev. UDO Agríc.* 9(4):848-856.
- Nesher, I.; Barthoom, S. and Sharon, A. 2008 Cell cycle and cell death are not necessary for appressorium formation and infection in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *BMC. Biology*. 6(9):1-11.
- Ochoa, J. L.; Hernández, M. H.; Latisnere, B. J. L.; León-de-la-Cruz y Larralde, C. C. P. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, Mexico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5(5):352-359.
- Pérez, C. L. M.; José, S. M. y Beltrán, H. J. D. 2003. Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 5(1): 24-35.
- Rodríguez, E. S.; Cárdenas, E.; Hernández, S.; Gutiérrez, A. y Mayek, N. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. de frutos de aguacatero. *Rev. Bras. Frutic.* 35(3):898-905.
- Rodríguez, E. S.; González, J. M. y Mayek, N. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): aspectos bioquímicos y genéticos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27(1): 53-63.
- Rondón, O.; Sanabria de Albarracín, N. y Rondón, A. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Agron. Trop.* 56(2):219-235.

- Rojas, E. I.; Rehner, S. A.; Samuels, G. J.; Van-Bael, S. A.; Herre, E. A.; Cannon, P.; Chen, R.; Wang, R.; Zhang, Y.; Peng, Y. Q. and Sha, T. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus Phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycology*. 102(6):1318-1338.
- SAGARPA. 2014. Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta. www.sagarpa.gob.mx.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Tercera (Ed.). Volumen 1. New York, EUA: CSHL Press.
- Santander, P. A. 2012. Uso de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn para el control de (*Colletotrichum gloeosporioides* penz.) causante de la antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). Facultad de Agronomía Postgrado en Agronomía- Universidad Central de Venezuela 5-26 pp.
- SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. www.siap.gob.mx.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey, J. A. and Jeger, M. J. (Eds.). *Colletotrichum*. Biology, pathology and control. Wallingford, UK: CAB International. 1-26 pp.
- Tamez-Guerra, P.; Galán-Wong, L.J.; Medrano-Roldán, H.; García-Gutiérrez, C.; Rodríguez-Padilla, C.; Gómez-Flores, R.A.; Tamez-Guerra, R.S. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Universidad Autónoma de Nuevo León. Ciencia*. 4(2):143-152.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. and Talor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. In: Innis, N.; Gelfand, D.; Sninsky, J. and White, T. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York. pp 315-322.
- Yang, Y. L.; Liu, Z. Y.; Cai, L.; Hyde, K. D.; Yu, Z. N. y McKenzie, E. H. C. 2009. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity* 39: 123-146.