



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA
"PRESIDENTE JUÁREZ"

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MORFOLOGÍA, SENSIBILIDAD *in vitro* Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE
Colletotrichum spp., OBTENIDAS DE AGUACATE "HASS"
EN MICHUACÁN**

TESIS

QUE PRESENTA

JULIO CÉSAR TOVAR ROCHA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE
CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO

URUAPAN, MICHUACÁN, AGOSTO DE 2009.

DEDICATORIAS

A mis padres: Gerardo Tovar Bermúdez y Ma. Elena Rocha Granados, mis mejores amigos, quienes siempre me han brindado su ayuda y apoyo incondicional para poder cumplir todas mis metas, mediante su infinito amor y comprensión, aún en los momentos más difíciles.

A mis hermanas: Selene y Violeta, amigas y cómplices en tantos momentos juntos.

Con cariño para mis abuelos: Don J. Jesús Rocha Granados y Doña Guadalupe Granados Martínez por compartir conmigo sus consejos, experiencia, pero sobre todo su gran amor.

A la memoria de mis abuelos: Don Gerardo Tovar León y Doña Juana Bermúdez León, que fueron y seguirán siendo un gran ejemplo de vida para mí.

A todos mis familiares, con quienes he pasado muchos momentos de alegría, pero también algunos de tristeza.

A todos mis amigos y amigas, pues los considero y seguiré considerando muy importantes en mi desarrollo como persona.

Julio César Tovar Rocha

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo Institucional de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

A la Coordinación de la Investigación Científica, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Comité Nacional del Sistema Producto-Aguacate A. C., por el apoyo financiero para la realización de la presente investigación.

Al Lic. J. Alejandro Álvarez del Toro, Presidente del Sistema Producto Aguacate, por la beca otorgada para facilitar mi ingreso al Programa de Maestría Institucional en Ciencias Biológicas.

Agradezco, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado a través de la beca 216636.

Un muy sincero y especial agradecimiento al Dr. Héctor Guillén Andrade, director del presente trabajo de investigación, por sus consejos, tiempo y disposición durante el desarrollo de este trabajo. De igual manera, al Dr. Miguel Martínez Trujillo por su gran apoyo, disposición y consejos. A los demás integrantes del Comité Tutorial: Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados, Dra. Maribel Gutiérrez Contreras y Dr. J. Agustín Vidales Fernández, por su ayuda y sugerencias para realización de esta investigación.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Maribel Gutiérrez Contreras por su apoyo y consejos.

Agradezco también, a la Dra. Patricia Delgado Valerio, por las facilidades brindadas para la culminación de este trabajo.

En particular, agradezco de forma muy especial a la Dra. Ma. del Carmen Rocha Granados por su gran apoyo incondicional a lo largo de la presente investigación.

A las ingenieras: Alejandra Mondragón Flores, Adriana Alemán Aguilar y María José Colunga; así como, a las estudiantes: Noelia Román Ruíz y Eva Miriam Vázquez Becerra. A todas ellas mil gracias por su apoyo en las actividades de laboratorio, pero sobre todo por ofrecerme su amistad.

A mis profesores, por compartir su experiencia y conocimientos en esta etapa de mi formación.

A mis compañeros, por su amistad, experiencia y momentos compartidos.

A la M. C. Teresita del Carmen Ávila Val, por su apoyo y consejos.

Un agradecimiento a todo el personal del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por la oportunidad que se nos brinda a los estudiantes en nuestra formación profesional. Así mismo, agradezco en forma especial a la Sria. Liliana Barriga Cerritos, por su enorme ayuda en los trámites administrativos del posgrado.

A las demás personas que de alguna manera se involucraron conmigo a lo largo del desarrollo del presente trabajo.

Por último, un muy grande y especial agradecimiento a todos los mexicanos, que con sus impuestos me han dado la oportunidad de prepararme para seguir sirviendo a nuestro país.

Julio César Tovar Rocha

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	v
RESUMEN GENERAL.....	vi
SUMMARY.....	vii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVOS.....	7
RESULTADOS.....	8
MORFOLOGÍA, SENSIBILIDAD <i>in vitro</i> Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE <i>Colletotrichum</i> spp., OBTENIDAS DE AGUACATE “HASS” EN MICHOACÁN.....	8
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	42
LITERATURA CITADA.....	43

PERSPECTIVAS.....	54
APÉNDICE.....	55

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Origen de las cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., aisladas de frutos de aguacate.....	19
Cuadro 2. Grupos patogénicos, origen e identidad de las cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., aisladas de aguacate.....	20
Cuadro 3. Fungicidas y dosis empleadas para la determinación de la ED ₅₀ de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp.....	22
Cuadro 4. Componentes de la reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos ColF y ColR, diseñados para distinguir el género <i>Colletotrichum</i> de otros hongos.....	24
Cuadro 5. Componentes de la reacción de amplificación utilizando la combinación de oligonucleótidos CgInt/ITS4 y CaInt2/ITS4, para la identificación de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. acutatum</i> , respectivamente.....	25

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Histograma de frecuencias para la coloración de las colonias de <i>Colletotrichum</i> spp.....	26
Figura 2.	Textura observada en cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., aisladas de frutos de aguacate de Michoacán: textura tipo algodonosa (A) y textura tipo fieltro (B).....	27
Figura 3.	Forma de crecimiento ondulado (A) y circular (B) observado en cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., aisladas de frutos de aguacate.....	28
Figura 4.	Anillos concéntricos (A) presentes en <i>Colletotrichum</i> spp., aislado de frutos de aguacate, cultivado en Michoacán.....	28
Figura 5.	Dendograma de encadenamiento para tamaño de conidios (TC _{1-d}) de <i>Colletotrichum</i> spp.....	29
Figura 6.	Dendograma generado para tasa de crecimiento (T _{crec}) de las 20 cepas de <i>Colletotrichum</i> spp.....	30
Figura 7.	Inhibición del crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> (40-TG) (A) y <i>C. acutatum</i> (10-TC) (B) ante la ED ₅₀ de benomilo.....	33
Figura 8.	Inhibición de crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> (A) y <i>C. acutatum</i> (B) ante la ED ₅₀ de mancozeb.....	35
Figura 9.	Inhibición del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> (A) y <i>C. acutatum</i> (B) ante la ED ₅₀ de oxiclورو de cobre.....	37
Figura 10.	Inhibición del crecimiento de la colonia de <i>C.gloeosporioides</i> (A) y <i>C. acutatum</i> (B) ante la ED ₅₀ de folpet.....	39
Figura 11.	Patrón de bandas detectado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Col-F/Col-R específicos para <i>Colletotrichum</i> spp.....	40
Figura 12.	Patrón de bandas obtenido mediante PCR de muestras de ADN de 20 cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., amplificado con la combinación de los oligonucleótidos CgInt/ITS4 (A) y CaInt2/ITS4 (B), específicos para <i>C. gloeosporioides</i> y <i>C. acutatum</i> respectivamente.....	41

LISTA DE CUADROS DEL APÉNDICE

	Página
Cuadro 1A. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de benomilo de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., aisladas de aguacate.....	55
Cuadro 2A. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de mancozeb de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., aisladas de aguacate.....	55
Cuadro 3A. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de oxiclورو de cobre de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., aisladas de aguacate.....	55
Cuadro 4A. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de folpet de cepas de <i>Colletotrichum</i> spp., aisladas de aguacate.....	55
Cuadro 5A. Componentes e reacción de la solución para la extracción de ADN de hongos filamentosos.....	56
Cuadro 6A. Componentes de la reacción fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (50: 49: 1 v/v).....	56
Cuadro 7A. Componentes de reacción para la solución de gel TAE 10 X.....	57
Cuadro 8A. Componentes de reacción para la solución de gel TBE 5X.....	57
Cuadro 9A. Componentes de reacción para la solución de gel SGB 5X.....	58

INTRODUCCIÓN GENERAL

El aguacate es originario de México y Centroamérica, existe evidencia de su selección y consumo en México desde hace aproximadamente diez mil años (Smith 1966, Sánchez *et al.* 2001) y actualmente se cultiva en una amplia gama de ambientes que van desde el mediterráneo semiárido hasta el tropical húmedo (Pegg *et al.* 2007). El cultivo del aguacate, tiene además una gran importancia social, ya que por su actividad se generan alrededor de 47 mil jornales permanentes al año, 70 mil empleos estacionales, equivalentes a un total de 10.5 millones de jornales anuales, así como 187 mil empleos indirectos permanentes (Guillén-Andrade *et al.* 2007). Hoy en día, el aguacate es cultivado en sesenta países, donde México sobresale como mayor productor con 117,311.76 ha (FAOSTAT 2007), esto gracias al estado de Michoacán, en el que sobresalen 22 municipios, donde los huertos están establecidos principalmente en zonas con climas cálidos, semicálidos y templados (Guillén-Andrade *et al.* 2007), razón por la cual en el estado de Michoacán es uno de los principales exportadores de aguacate “Hass” al mercado de los Estados Unidos de Norteamérica, con una cantidad de 104,815.590 t de octubre del 2005 a septiembre del 2006 (comunicación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos – USDA, sección Uruapan). Lo anterior, es posible gracias a que el aguacate se encuentra disponible para consumo todo el año, debido a las diferentes condiciones agroclimáticas en que se encuentra establecido el cultivo; sin embargo, el cultivo presenta factores que limitan su producción y calidad por la presencia de enfermedades, plagas y daños ocasionados por factores físicos como la temperatura, humedad, tipo de suelo, heladas y granizadas (Guillén *et al.* 2007). De estos factores, las enfermedades de tipo fungoso toman gran relevancia y sus apariciones están relacionadas con la presencia de una alta humedad relativa y abundante precipitación, además de daños en los tejidos producidos por heladas y granizadas que favorece la aparición de ellas (Wolstenholme 2007, Agrios 1989). Dichas enfermedades pueden llegar a afectar la producción hasta en un 40 % (Morales y Vidales 1994) y son consideradas de gran importancia por su número, distribución, intensidad y como un factor en los costos de producción (Dodd *et al.* 1992).

La antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum* spp., y su teleomorfo *Glomerella* es considerada una de las enfermedades de mayor importancia a nivel mundial con una distribución cosmopolita en la naturaleza de más de mil especies (Herrera y Ulloa 2004), siendo más frecuente en zonas tropicales y subtropicales (Bailey y Jeger 1992). Bajo estas

condiciones es común que el género *Colletotrichum* se encuentre presente ocasionando dicha enfermedad; la cual, tiene una importancia significativa en cereales, pastos, legumbres, hortalizas y cultivos perennes, incluyendo árboles frutales (Bailey y Jeger 1992), como son manzana, durazno, kiwi, guayaba, almendra, mora azul, cítricos, mango, olivo y aguacate (Peres *et al.* 2001, Freeman 2000, Adaskaveg y Hartin 1997). Viene a bien citar, que algunos casos han sido reportados en donde varias especies y biotipos de *Colletotrichum* están asociados a un simple hospedero. Por ejemplo, la antracnosis en aguacate y mango, ocasionada por *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, afecta los frutos predominantemente como una enfermedad de post-cosecha (Hartill 1992, Prior *et al.* 1992, Prusky 1996). Fresa puede ser infectado por tres especies de *Colletotrichum*, *C. fragariae*, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* causando antracnosis en fruto y otras partes de la planta (Howard *et al.* 1992). Mientras que nuez y otros frutos deciduos pueden ser infectados por *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Adaskaveg y Hartin 1997, Bernstein *et al.* 1995, Shabi y Katan 1983, Shi *et al.* 1996). Así mismo, en cítricos, *Colletotrichum* puede infectar ocasionando distintas enfermedades a causa de las especies *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* (Zulficar *et al.* 1996).

En el caso de aguacate, donde la enfermedad está especialmente reconocida como la causa de problemas en precosecha y poscosecha (Sutton 1992). La antracnosis en poscosecha es el principal problema por las pérdidas que ocasiona de hasta el 71 %, a causa de las infecciones latentes (Binyamini y Schiffmann 1972, Prusky 1983, Agrios 1989, Fitzell 1987, Prusky *et al.* 1992, Dodd *et al.* 1992, Prusky *et al.* 2000, Arauz 2000). La antracnosis que produce este género es muy común y destructiva (Agrios 1989), y sus síntomas varían según el órgano afectado (Téliz y Mora 2007), siendo el fruto una de las partes más comunes donde se presenta esta enfermedad. Los síntomas suelen ser lesiones necróticas que al remover la epidermis del fruto se observan manchas oscuras con círculos concéntricos que se extienden a la pulpa y en ocasiones puede existir rajadura de la epidermis (Romero 1993, Téliz y Mora 2007). Otro síntoma consiste en manchas redondas, pequeñas y rojizas, que conforme pasa el tiempo toman una coloración negra y una consistencia áspera, por su aspecto también se le ha conocido como “viruela”, “sarampión”, “clavo” y “varicela” (Martínez 1975, Morales y Vidales 1994) conocido también como “pepper spot” (Willinham *et al.* 2000), los cuales pueden presentarse en frutos de aguacate “Hass” en Michoacán desde precosecha, cuando se presentan condiciones que favorecen el desarrollo del hongo como son la alta humedad

relativa y la temperatura, que según Adaskaveg y Hartin (1997) puede ser desde los 10 hasta los 30 °C para el desarrollo de *Colletotrichum*.

Colletotrichum y los daños que provoca en aguacate son considerados de los más importantes en todas las zonas productoras del mundo, ya que son un problema para el comercio internacional, por la forma directa en que afectan al fruto desde precosecha, y principalmente durante su almacenaje (Everett y Pak 2002, Pegg *et al.* 2007, Whiley *et al.* 2007). El control de este patógeno representa uno de los mayores gastos económicos (Gallegos 1983), por lo que se sugiere implementar una estrategia de manejo integrado que considere prácticas agronómicas durante las etapas de pre y poscosecha (Téliz y Mora 2007), que incluyen la higiene del árbol, la aplicación de fungicidas antes y después de la recolección y la optimización de las condiciones de conservación en poscosecha como temperatura de maduración y maduración controlada. Una posible causa de la alta incidencia de *Colletotrichum* en el aguacate de Michoacán, México, es que la variedad predominante (Hass) se tiene establecida sobre patrones de la raza mexicana, los cuales son más susceptibles al daño causado por este hongo (Willingham *et al.* 2001, Anderson *et al.* 2003), además de que en el 50 % de la superficie con aguacate, las huertas presentan entrecruzamiento de ramas, lo que ocasiona un microclima (Sánchez *et al.* 2001) con humedad relativa alta (80 %). En la mayoría de los países en que se cultiva aguacate, la antracnosis se le atribuye a la especie *C. gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc. (Binyamini y Schiffmann 1972, Fitzell 1987, Dodd *et al.* 1992, Prusky 1992, Morales y Vidales 1994). Sin embargo, en otros países además se ha relacionado a *C. acutatum* con la enfermedad como en Nueva Zelanda (Hartill 1991), Australia (Coates *et al.* 1995) y México (Gutiérrez 2008).

La clasificación taxonómica de especies de *Colletotrichum* y de su teleomorfo *Glomerella* es confusa y muy insatisfactoria (Bonde *et al.* 1991), ya que se ha hecho principalmente con base a criterios descriptivos clásicos, tales como características morfológicas, tipo de daño en el hospedero (O'Connell *et al.* 2000), la identidad de hospedero, además de pruebas de virulencia (Alexopoulos y Mimms 1985, Bailey y Jeger 1992, Abang *et al.* 2001). Sin embargo, la evolución de los sistemas para la identificación de las especies en los últimos 200 años, ha dado como resultado cambios en los conceptos referente a la importancia de diferentes aspectos de la morfología de *Colletotrichum* (Sutton 1992), gracias al uso de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y al empleo de pruebas serológicas conocidas

como “ELISA” (Ensayo de inmunoabsorbancia de una enzima ligada) que han venido a reforzar los métodos tradicionales de clasificación (Afanador *et al.* 2003, Brown *et al.* 1996, Mills *et al.* 1992, White *et al.* 1990).

Dentro del género *Colletotrichum*, son comunes las especies intermedias por el rango de variación tanto en tamaño como en forma de conidios, considerado para muchas especies y por los rasgos morfológicos que pueden variar considerablemente con las condiciones ambientales, lo que hace difícil comparar los cultivos *in vitro* con material observado directamente de tejidos infectados de plantas (Cannon *et al.* 2000). La relación de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* como causantes de antracnosis en varios cultivos, necesita ser comprendida para poder resolver la controversia acerca de la identidad de las especies (Talhinhas *et al.* 2002), ya que estas especies son morfológicamente parecidas y su separación taxonómica es difícil basándose solo en estas características y en la inoculación artificial de sus hospederos, la cual no es lo suficientemente confiable (Sutton 1992), debido a que ambas especies pueden atacar un mismo hospedero; sin embargo, nos indica el potencial de infección por lo que la especificidad de hospederos debería ser determinada bajo condiciones naturales (Freeman 2000). Las dos especies (*C. gloeosporioides* y *C. acutatum*) reportadas, causando antracnosis en aguacate (Freeman *et al.* 1998, Gutiérrez 2008), se separan en la taxonomía tradicional, básicamente por las características de tamaño y forma de conidios, donde Sutton (1992) señala que *C. acutatum* tiene conidios fusiformes de 8.5-16.5 x 2.5-4 μm , mientras que *C. gloeosporioides* presenta conidios de forma cilíndrica, con ápices obtusos y base truncada, los cuales miden 12-17 x 3.5-6 μm . La clasificación de hospederos, así como por la tasa de crecimiento de su micelio, son otras características tomadas en cuenta para la separación de especies y refiriéndonos a esta última, se cita que la velocidad de crecimiento de *C. acutatum* es más lenta en comparación con *C. gloeosporioides* (Smith y Black 1990, Sutton 1992, Gunnell y Gubler 1992, Denoyes y Braudry 1995, Guarro *et al.* 1999). Otras características más que se han usado para diferenciar estas especies son: temperatura, donde Adaskaveg y Hartin (1997), determinaron un índice óptimo de crecimiento de 25 °C para *C. acutatum*, aislado de fresa, almendro y durazno, mientras que los aislamientos de *C. gloeosporioides* de cítricos y papaya tuvieron un índice óptimo de crecimiento a 30 °C. De la misma manera, se han hecho estudios para analizar la diversidad genética de este género; entre estos se pueden señalar los enfocados a determinar resistencia a productos químicos como los hechos en

manzano, melocotón y nogal, en donde se obtuvieron 72 aislamientos de *Colletotrichum* que se separaron por sensibilidad a benomilo, entre otras pruebas. Así, bajo este criterio se obtuvieron dos grupos: uno que creció aparentemente sin ningún problema sobre medio de cultivo (PDA) con benomilo (colonias rosas-naranja y conidios fusiformes) y otro que agrupó aislamientos que crecieron escasamente o no crecieron en medio con benomilo (colonias grises y conidios con extremos redondeados). Los aislamientos correspondieron a *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*, respectivamente (Bernstein *et al.* 1995, Gutiérrez 2008). El benomilo se ha aprovechado como apoyo para la separación de especies (Freeman 2000) y en estudios hechos con cepas de *Colletotrichum* se obtuvo que *C. acutatum* es menos sensible a la acción de benomilo (Adaskaveg y Hartin 1997, Bernstein *et al.* 1995, Freeman *et al.* 1998), a diferencia de *C. gloeosporioides* (Peres *et al.* 2002, Maymon *et al.* 2006, Peres *et al.* 2004), que presentó mayor sensibilidad al fungicida, sin embargo, ambas especies presentaron sensibilidad a captan (Adaskaveg y Hartin 1997). Sánchez (1994), haciendo pruebas para el control de *C. gloeosporioides* en árboles de guanábana, determinó que el bitertbanol (100 g ha⁻¹) fue el que mejor controló a este patógeno, seguido de la mezcla benomilo + mancozeb (135 + 242 g ha⁻¹). En otro estudio hecho para el control *in vitro* de *Colletotrichum* se determinó que captan, folpet y la mezcla prochloraz-z/folpet tuvieron mejor control que la mezcla prochloraz-zn (Freeman *et al.* 1997). En más al respecto, en pruebas realizadas en aceituna jabonosa para conocer el efecto de diversos fungicidas sobre el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum*, se observó que los productos sistémicos difenoconazol, flusilazol y benomilo, fueron más efectivos en comparación con los productos de contacto (captan, maneb y zineb) excepto folpet que exhibió un efecto similar a los productos sistémicos; mientras que los fungicidas cúpricos (hidróxido, oxiclورو, óxido y sulfato) resultaron casi inefectivos en el control de *Colletotrichum* (Rodríguez 2002).

La morfología y genética del género *Colletotrichum* ha sido analizada por varios investigadores (Bailey y Jerger 1992, Morales 1996). Los métodos tradicionales de identificación y clasificación se basan por lo general en la forma y tamaño de los conidios, sin embargo, este criterio es hoy en día insuficiente para discernir sobre especies (Freeman *et al.* 1998), debido a lo anterior, este tipo de caracterizaciones son muy limitadas en comparación con las que se pueden hacer a nivel molecular. Al respecto se han hecho algunos trabajos que incluyen análisis a nivel de ADN (Braithwaite y Manners 1989, Freeman *et al.* 1998, Freeman

2000, Morales 1996). Hoy en día, la diferenciación de especies de *Colletotrichum* spp. a nivel molecular, es una herramienta que nos proporciona mayor certidumbre en cuanto a la identificación de que especies de *Colletotrichum* se refiere. Para esto se han diseñado oligonucleótidos específicos (ITS) de ADN ribosomal (Freeman *et al.* 2000, Abang *et al.* 2005, Abang *et al.* 2006), que ha sido usado para estimar la diversidad genética intraespecífica de *Colletotrichum gloeosporioides* (Freeman *et al.* 1996, Freeman *et al.* 1998), en combinación con el iniciador específico CgInt (Adaskaveg y Hartin 1997). En otro trabajo, Afanador y colaboradores. (2003), identificaron a *C. gloeosporioides* en tamarilla, pasiflora y mango usando la combinación CgInt/ITS4. Pero también, la especie *C. acutatum* ha conseguido ser caracterizada molecularmente usando la combinación de oligonucleótidos CaInt2/ITS4 con los que se consiguieron productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de entre aproximadamente 500 y 560 pares de bases (pb) (Freeman *et al.* 2000, Freeman *et al.* 2001, Rivera 2006, Afanador *et al.* 2003, Talhinhos *et al.* 2005). Con el uso de estos oligonucleótidos específicos para caracterizar ambas especies se han detectado la presencia de estos patógenos en diversos hospederos, incluyendo aquellos en los que no había reportes de su existencia (Adaskaveg y Hartin 1997; Föster y Adaskaveg 1999, Freeman *et al.* 2001, Gutiérrez 2008).

HIPÓTESIS

En la franja aguacatera del estado de Michoacán la enfermedad conocida como antracnosis está relacionada con la presencia de diferentes especies del género *Colletotrichum* y su variabilidad genética puede ser analizada mediante estudios morfológicos, sensibilidad *in vitro* a fungicidas así como en el nivel de ADN.

OBJETIVOS

Objetivo general

Generar conocimiento sobre la diversidad genética de los agentes causantes de la antracnosis, que pueda ser utilizada en el diseño de estrategias de control más eficientes en la región aguacatera de Michoacán.

Objetivos específicos

Caracterizar morfológicamente cepas de *C.gloeosporioides* y *C. acutatum.*, aisladas de frutos de aguacate del estado de Michoacán.

Analizar la sensibilidad *in vitro* a fungicidas de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum.*, aisladas de frutos de aguacate en el estado de Michoacán.

Identificar molecularmente en el nivel de ADN las cepas de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum.*, relacionadas con la antracnosis en el cultivo del aguacate en Michoacán.

RESULTADOS

MORFOLOGÍA, SENSIBILIDAD *in vitro* Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Colletotrichum* spp., OBTENIDAS DE AGUACATE “HASS” EN MICHOACÁN

RESUMEN

El cultivo del aguacate en Michoacán, México prospera en distintas zonas agroecológicas favorables, donde la temperatura y la humedad son factores benéficos para el desarrollo de enfermedades de tipo fungoso como la antracnosis ocasionada por especies del género *Colletotrichum*. Este patógeno afecta principalmente a frutos de aguacate, evitando su comercialización ya que sus daños son más frecuentes en poscosecha a causa de las infecciones latentes. Lo anterior es debido en parte, a la falta de conocimiento sobre la diversidad de especies relacionadas con la enfermedad. Se conoce que la antracnosis es ocasionada por *C. gloeosporioides*, sin embargo, estudios recientes han demostrado la presencia de *C. acutatum* como un agente causal más. Por tal motivo, en el presente trabajo se planteó el objetivo de generar conocimiento sobre la diversidad de dichas especies mediante estudios morfológicos de 20 cepas, tomando en cuenta las siguientes variables: coloración de la colonia, textura del micelio, tasa de crecimiento (T_{crec}), formación de estrías y anillos concéntricos, además de tamaño (TC_{1-d}) y forma de conidios. Otro estudio, fue la evaluación de la sensibilidad *in vitro* mediante el empleo de la ED_{50} de los fungicidas: benomilo, mancozeb, oxiclورو de cobre y folpet; aunado al análisis molecular donde se utilizaron los oligonucleótidos Col-F y Col-R para distinguir el género de las cepas y los oligonucleótidos específicos CgInt y CaInt2 para detectar a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* respectivamente. Los resultados mostraron variaciones morfológicas entre las cepas, además de una respuesta diferente de ellas ante la ED_{50} de los fungicidas, sin encontrar relación entre su sensibilidad y el grupo patogénico al que pertenecen. Finalmente los resultados mediante PCR permitió detectar la presencia de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*; además de la posible existencia de otras especies de *Colletotrichum* relacionadas con la enfermedad.

ABSTRACT

The avocado crop in Michoacan, Mexico prospers in different agro-ecological zones, where temperature and humidity are beneficial factors for the development of fungus diseases like anthracnose caused by species of *Colletotrichum* genus. This pathogen mainly affects avocado fruit, avoiding its commercialization because of its damages are more frequent in post-harvest due to latent infections. The previous thing must partly, to the lack of knowledge on the diversity of species related to the disease. It is known that the anthracnose is caused by *C. gloeosporioides*, however, recent studies have demonstrated the presence of *C. acutatum* like another causal agent. Because of this, the main aim of the present work was to generate knowledge on the diversity of these species by morphological studies of 20 strains, including the following variables: culture coloration, mycelium texture, rate of growth (T_{cree}), ring concentric formation and striation, in addition to the size (TC_{1-d}) and form of conidia. Another study was the *in vitro* sensitivity evaluation by using the ED_{50} of the next fungicides: benomyl, mancozeb, copper oxychloride and folpet; and molecular analysis where Col-F and Col-R oligonucleotids were used to distinguish the strains genus and CgInt, CaInt2 specific oligonucleotids to detect *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* respectively. The results showed morphological variations between strains, and also, a different answer of them to ED_{50} of the fungicides, without finding relationship between its sensitivity and the pathogenic group to which they belong. Finally the results of PCR allowed the detection of *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*; in addition to the possible existence of other species of *Colletotrichum* related to the disease.

INTRODUCCIÓN

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es una especie vegetal que se originó aparentemente en el área cercana al este y centro de las altas tierras de México, a través de Guatemala hacia la costa del pacífico de América central hasta llegar a Perú, con exclusión de las Antillas, donde fue introducido sucesivamente (Popenoe 1920, Smith 1966, Storey *et al.* 1986). Williams (1977), afirma lo anterior señalando que el aguacate es una planta nativa de América, que tiene su origen en la región que antiguamente se conocía como Mesoamérica y que actualmente corresponde a la región del centro de México hasta Guatemala. Una evidencia

arqueológica indica que la utilización y selección de este cultivo en México se ha hecho por un periodo de diez mil años. Prueba de esto, fueron las semillas encontradas en las cuevas del Valle de Tehuacán, Puebla; las cuales mostraron que durante ese tiempo hubo una selección progresiva para incrementar el tamaño del fruto. Lo anterior se concluyó debido al aumento en tamaño que presentaron las semillas descubiertas, en comparación con otras encontradas y presumiblemente también para otras cualidades deseadas (Smith 1966). Después de la llegada a América de los colonizadores, el cultivo se distribuyó a otras zonas (Sánchez *et al.* 2001). Actualmente se cultiva en una amplia gama de ambientes que van desde el mediterráneo semiárido hasta el tropical húmedo (Pegg *et al.* 2007). Hoy en día, en México, el estado de Michoacán, es considerado el principal productor de aguacate a nivel mundial (FAOSTAT 2007), donde existen principalmente 22 municipios productores, en donde los huertos están establecidos principalmente en zonas con climas cálidos, semicálidos y templados (Guillén *et al.* 2007). Dichas condiciones climáticas son también un factor favorable para el desarrollo de patógenos (Gutiérrez 2008), como es el caso de *Colletotrichum* spp. y su teleomorfo *Glomerella*, considerados como algunos de los principales patógenos de plantas en el mundo (Freeman *et al.* 1998) que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza con más de mil especies (Herrera y Ulloa 2004), atacando pastos, legumbres, vegetales, frutillas y árboles perennes (Waller 1992, Buritica 1995, Ávila 2003), en donde, es causante de la antracnosis, varicela y la viruela o clavo en frutos de aguacate, tanto en campo como en almacén (Gutiérrez 2008).

Las antracnosis ocasionada por *Colletotrichum* spp., es una enfermedad que puede afectar el follaje, tallos, flores o frutos en desarrollo donde típicamente se manifiesta como manchas grandes o pequeñas de colores oscuros, o lesiones ligeramente sumidas que poseen un contorno ligeramente levantado (Gutiérrez 2008). Sin embargo, dichos síntomas y formas de ataque pueden variar dependiendo del órgano afectado. Aunque este patógeno puede desarrollar la enfermedad en aguacate en campo (Téliz 2000), su principal daño se manifiesta en poscosecha (Bailey y Jeger 1992), causando pérdidas de hasta el 71 % por las infecciones quiescentes (latentes) que presenta (Binyamini y Schiffmann 1972, Prusky 1983, Agrios 1989, Fitzell 1987, Prusky *et al.* 1992, Dodd *et al.* 1992, Prusky *et al.* 2000, Arauz 2000). Se ha observado que los frutos inmaduros de aguacate presentan resistencia al ataque de *Colletotrichum* debido, a la presencia de un compuesto antifúngico (Prusky y Keen 1993)

llamado dieno, que se encuentra en el pericarpio de los mismos (Prusky *et al.* 1982). Este compuesto mantiene al patógeno en estado de latencia antes de la cosecha (Prusky *et al.* 1992). Debido a que el aguacate es un fruto climatérico, la quiescencia o el estado de latencia termina con la reducción de compuestos antifúngicos a causa de la enzima lipoxigenasa, la cual degrada el dieno y como consecuencia incrementa la susceptibilidad del fruto al ataque de *Colletotrichum*. Otra causa de la degradación de los compuestos antifúngicos es la producción del etileno por la maduración del fruto y la elevación de la temperatura del fruto, que además favorece la diseminación de la enfermedad sobre el mismo (Prusky 1996, Pusky *et al.* 1983, Flaishmann y Kolattukudy 1994). Los daños causados por *Colletotrichum*, en frutos de aguacate “Hass” en Michoacán, se manifiestan con síntomas distintos en precosecha que son favorecidos por la alta humedad relativa y la temperatura que oscilan entre los 10 y los 30 °C (Adaskaveg y Hartin 1997). A estas sintomatologías, se les ha dado los siguientes nombres locales: viruela o clavo, antracnosis, varicela, sarampión y marchitez o muerte descendente de ramas (Martínez 1974, Morales y Vidales 1994, Téliz y Mora 2007, Santacruz y Morales 2001). Las lesiones en fruto se caracterizan por ser circulares de color café, hundidas que posteriormente se tornan de color negro, de consistencia áspera y seca, volviéndose prominentes, este síntoma es también señalado por Fitzell (1987) como lesiones de tipo 1 asociadas a daños por insectos; en el caso de la varicela (Morales y Vidales 1994, Martínez-Barrera 1974) o lesión tipo 2, asociadas a las lenticelas (Fitzell 1987), se presentan como lesiones muy pequeñas (< 2 mm) aisladas en un inicio y dependiendo de las condiciones ambientales favorables (Morales y Vidales 1994) en humedad relativa (85 - 90 %) y temperaturas (18 y 25 °C) pueden llegar a coalescer formando lesiones mayores que son conocidas principalmente como la típica antracnosis. En el síntoma de antracnosis se presentan lesiones circulares o irregulares, color café oscuro de 2 mm de diámetro, hundidas de aspecto de pudrición ligeramente húmedo y de consistencia suave, las que en presencia de una alta humedad relativa del 95% favorece la germinación de conidios de color salmón o rosa y la formación de apresorios (Morales y Vidales 1994, Santacruz y Morales 2001, Martínez 1974, Ávila 2007, Akem 2006, Pegg *et al.* 2007).

El control de este fitopatógeno representa uno de los mayores retos, así como gastos económicos (Gallegos 1983) por lo que se sugiere implementar una estrategia de manejo integrado que considere practicas agronómicas durante las etapas de pre y poscosecha (Téliz y

Mora 2007), que incluyen la higiene del árbol, la aplicación de fungicidas antes y después de la recolección y la optimización de las condiciones de conservación en poscosecha como temperatura de maduración y maduración controlada. Una posible causa de la alta incidencia (Morales y Vidales 1994) de *Colletotrichum* en el aguacate de Michoacán, es que la variedad predominante (Hass), se tiene establecida sobre patrones de la raza mexicana, los cuales son más susceptibles al daño por *Colletotrichum* (Willingham *et al.* 2001, Anderson *et al.* 2003), además de que en el 50% de la superficie con aguacate, las huertas presentan entrecruzamiento de ramas, lo que ocasiona un microclima (Sánchez *et al.* 2001) con humedad relativa alta (80%); además de la relación que esto tiene con las diferencias que existen en las concentraciones de dienos y nutrientes minerales.

En la mayoría de los países en que se cultiva aguacate, la antracnosis se le atribuye a la especie *C. gloeosporioides* (Penz) Penz. y Sacc. (Binyamini y Schiffmann 1972, Fitzell 1987, Dodd *et al.* 1992, Prusky 1992, Morales y Vidales 1994); sin embargo, en otros países además se ha relacionado a *C. acutatum* con la enfermedad como en Nueva Zelanda (Hartill 1991) y en Australia (Coates *et al.* 1995). Estas especies son morfológicamente similares, además de ser semejantes en el rango de hospederos (Freeman 2000, Wharthon y Dieguez 2004), pero se pueden diferenciar en base a la morfología de las colonias, conidios, tasa de crecimiento y compatibilidad vegetativa. Aunque la diferenciación celular es necesaria para facilitar estudios epidemiológicos (Abang *et al.* 2005), a pesar de las anteriores características para su diferenciación, su similitud ha causado confusión en la separación de estas especies y es probable que sea la causa de los escasos reportes en las otras zonas productoras del mundo; debido a que muchas de las cepas de *C. acutatum* se han identificado como *C. gloeosporioides* (Wharthon y Dieguez 2004), pues en medio de cultivo el hongo puede tener la habilidad de formar esporas ovoides, lo cual es una característica de *C. gloeosporioides* (Du *et al.* 2005). La clasificación taxonómica de especies de *Colletotrichum*, y de su teleomorfo *Glomerella*, es confusa y muy insatisfactoria (Bonde *et al.* 1991), ya que se ha hecho principalmente en base a criterios descriptivos clásicos, tales como características morfológicas, tipo de daño en el hospedero y la identidad de éste, además de pruebas de virulencia (Alexopoulos y Mimms 1985, Bailey y Jeger 1992, Abang *et al.* 2001). Sin embargo, la evolución de los sistemas para la identificación de las especies en los últimos 200 años, ha dando como resultado cambios en

los conceptos referente a la importancia de diferentes aspectos de la morfología de este patógeno (Sutton 1992).

Las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* que han sido reportadas causando antracnosis en aguacate (Freeman *et al.* 1998), se separan en la taxonomía tradicional, básicamente por las características de tamaño y forma de conidios y clasificación de hospederos, así como por la tasa de crecimiento de su micelio (Smith y Black 1990, Sutton 1992, Gunnell y Gubler 1992, Denoyes y Braudry 1995, Guarro *et al.* 1999). Sin embargo, todavía existe controversia en el tema y, en cualquiera de los esquemas propuestos, no se ha ganado la aceptación completa (Mills *et al.* 1992) debido principalmente a la gran plasticidad que presenta este patógeno sobre todo en condiciones de cultivo *in vitro* (Sutton 1992, Guarro *et al.* 1999), en las cuales, puede presentar variaciones en su morfología (Du *et al.* 2005). Así mismo, la diferenciación por el hospedero no siempre es confiable, debido a que actualmente se conoce que un mismo hospedero puede ser atacado por más de una especie de *Colletotrichum*, así como varios hospederos pueden ser atacados por una misma especie de este patógeno (Freeman 2000).

Colletotrichum gloeosporioides, es la especie más estudiada del género por la importancia que presenta al estar relacionada con un amplio rango de hospederos (Bailey y Jeger 1992); sin embargo, aún es considerada como un grupo de especies debido a que muestra un alto grado de variaciones morfológicas (Sutton 1992), que varían de acuerdo al hospedero afectado, como las observadas en las tonalidades de la coloración del micelio (Sutton 1992, Martínez y Zambrano 1994, Martín y García 1999, Afanador *et al.* 2003, Smith y Black 1990, Du *et al.* 2005, Freeman *et al.* 1998).

Al comparar el diámetro de crecimiento de la colonia de *C. gloeosporioides* versus *C. acutatum*, se tienen reportes que ésta última presenta un diámetro menor (Simmonds 1965, Sutton 1992, Freeman 2000), con respecto a *C. gloeosporioides*, donde se tiene reportes desde 1.6 hasta 15 mm día⁻¹ de diámetro de crecimiento.

Respecto al tamaño y morfología de conidios, Adaskaveg y Hartin (1997), indican que estas características pueden variar dependiendo del medio de cultivo y las condiciones en que se desarrollen, considerando al PDA (papa, dextrosa, agar) como el medio estándar para la descripción morfológica. Se ha determinado una gran amplitud del tamaño de conidios, para *C. gloeosporioides* reportan una longitud de 13-24 µm (Freeman *et al.* 2002, Du *et al.* 2005);

mientras que en otros estudios (Smith y Black 1990, Denoyes y Baudry 1995) se indican tamaños de 12.9-16.1 x 4.4-5.4 μm de longitud y diámetro respectivamente, además de Rivera-Vargas (2006), que reporta un tamaño de conidios de 12-20 x 3.5-5 μm .

En cuanto a la forma de los conidios, en diversos estudios hechos para *C. gloeosporioides* de cultivos diferentes, la forma es cilíndrica con terminaciones obtusas (Smith y Black 1990, Sutton 1992, Gunell y Gubler 1992, Denoyes y Baudry 1995, Freeman *et al.* 2002, Gutiérrez *et al.* 2002), cilíndrica con ápices ligeramente elipsoides (Rivera-Vargas *et al.* 2006), ovoide (Du *et al.* 2005) y circulares (Afanador *et al.* 2003).

Para el caso de la especie *C. acutatum*, aunque el número de hospederos en que se ha reportado es menor (Freeman 2000) que el de *C. gloeosporioides*, es un patógeno ampliamente distribuido en diversas especies silvestres y de cultivos como fresa, manzana, cítricos, semillas de algunos frutos, hojas de helechos, pinos, aguacate, mango, papaya, almendro (Smith y Black 1990, Adaskaveg y Hartin 1997, Freeman 2000, Adaskaveg y Förster 2000, Du *et al.* 2005, Peres *et al.* 2005); produciendo síntomas en flores, hojas, raíces, pecíolos, brotes y frutos. La especie *C. acutatum* ha sido identificada como patógeno de hospederos en los que estaban reportadas solo otras especies de *Colletotrichum*, considerado como una variación de alguna de ellas, principalmente, se le ha incluido dentro de la especie *C. gloeosporioides*; sin embargo, Simmonds (1965) logró la diferenciación de estas especies.

En estudios de *C. acutatum* se reporta una gran variación en el color de la colonia al frente y al reverso (Du *et al.* 2005), de gris, salmón, rosa, rojo; al frente, y rosa a carmín al reverso. Adaskaveg y Hartin (1997), indican tonalidades de gris a rosa con masas de esporas color naranja y el reverso comúnmente color naranja y ocasionalmente rojizo o gris. Talhinhos *et al.* (2005), reportaron colonias predominantemente de color blanco a beige con zonas grises y reverso verde olivo, amarillo, ligeramente rosa o carmín/color carne, púrpura o rojo y en menor frecuencia colonias grises. Smith y Black (1990), encontraron en esta especie colonias blancas durante los primeros días tornándose después beige, naranja, rosa, salmón y raramente olivo al reverso, mientras que Freeman y Katan, (1997), reportan solo colonias de color blanco; así mismo Lewis *et al.* (2004), determinaron colonias blancas tendiendo a rosa y tornándose gris verdoso en cultivos viejos, y el reverso de la colonia naranja, marrón o negro. En este mismo sentido, Peres y colaboradores (2005) señalan que *C. acutatum* presenta micelio blanco al inicio, cambiando a rosa o naranja por la presencia de masas conidiales. En

cuanto a la textura del micelio, Orozco y colaboradores (2004), reportan para esta especie micelio aéreo, de aspecto algodonoso compacto y moderadamente polvoriento.

El crecimiento de la colonia de *C. acutatum* ha sido estudiada presentando una gran variación. Así se tiene que Adaskaveg y Hartin (1997), determinaron una tasa de crecimiento para esta especie de 5-10 mm día⁻¹ a 30 °C; en estudios de esta especie en fresa, manzana, almendro y durazno (Talhinhas *et al.* 2005) donde reportan diámetros de crecimiento de la colonia de 18-45 mm en cinco días (3.6-9.0 mm día⁻¹) a 25 °C; Kim *et al.* (1999), en cepas obtenidas al azar de frutos (Compositae), obtuvieron un diámetro de crecimiento del micelio de 3.4-3.6 mm día⁻¹ en temperaturas de 24 a 26 °C, mientras que en arándano (Verma *et al.* 2006), el diámetro fue de 2.14 -3.57 mm día⁻¹ a 28 °C y en almendro (Freeman *et al.* 1998), de 4.9 a 9.9 mm día⁻¹ en temperaturas de 24 a 26 °C.

Una de las principales características para diferenciar *C. acutatum* de *C. gloeosporioides*, es la forma de los conidios, pues la primera especie presenta conidios fusiformes (Simmonds 1965, Smith y Black 1990, Sutton 1992, Walker *et al.* 1991, Kim *et al.* 1999, Du *et al.* 2005).

En cuanto al tamaño de los conidios, éste fluctúa de 8.5-16.5 x 2.5-4 µm de longitud y diámetro (Sutton 1992). Sin embargo, otros autores han determinado diversos tamaños: 9.3-16.9 x 3.1-5.4 µm (Du *et al.* 2005), 12.3-14.7 µm x 4.6-5.3 µm (Smith y Black 1990), 15 x 4 µm (Freeman y Katan 1997), 8-18 x 3-5 µm (Kim *et al.* 1999), 2.5-4.5 x 10-18 µm (Walker *et al.* 1991), 8-13 x 2-5 µm (Rivera *et al.* 2006) y 12.5-22.5 x 3.5-5 (Gunnell y Gubler 1992) de longitud y diámetro respectivamente. Por otra parte Simmonds (1965), indica que los conidios de *C. acutatum* son más pequeños que los de *C. gloeosporioides*.

Respecto a la sensibilidad a fungicidas, el benomilo se ha aprovechado como apoyo para la separación de razas (Freeman 2000) y en estudios hechos en cepas de *Colletotrichum* se obtuvo que *C. acutatum* es menos sensible a la acción de benomilo (Adaskaveg y Hartin 1997, Bernstein *et al.* 1995, Freeman *et al.* 1998), a diferencia de *C. gloeosporioides* (Peres *et al.* 2002, Maymon *et al.* 2006, Peres *et al.* 2004), que presentó mayor sensibilidad al fungicida, aunque ambas especies presentaron sensibilidad a captan (Adaskaveg y Hartin 1997). Otro estudio para determinar la sensibilidad de *C. gloeosporioides*, cultivado *in vitro* a benomilo se hizo usando el método de germinación de conidios en agar-agar, para lo cual primero se determinó la concentración necesaria para la inhibición del 90 % (CE 90) de los conidios, los

resultados indicaron que al disminuir la sensibilidad *in vitro* aumento la cantidad de fungicida para reducir la enfermedad en campo (Barquero y Arauz 1996). Sánchez (1994), haciendo pruebas para el control de *C. gloeosporioides* en árboles de guanábana, determinó que el bitertbanol (100 g ha⁻¹) fue el que mejor controló a este patógeno, seguido de la mezcla benomilo + mancozeb (135 + 242 g ha⁻¹). Otro estudio para el control *in vitro* de *Colletotrichum* mostró que captan, folpet y la mezcla prochloraz – z / folpet tuvieron mejor efecto de control que la mezcla prochloraz – zn (Freeman *et al.* 1997). En este mismo sentido, en un estudio hecho en aceituna jabonosa para conocer el efecto de diversos fungicidas sobre el crecimiento *in vitro* de *Colletotrichum*, se observó que los productos sistémicos difenoconazol, flusilazol y benomilo, fueron más efectivos en comparación con los productos de contacto (captan, maneb y zineb) excepto folpet que exhibió un efecto similar a los productos sistémicos; y por otro lado se encuentran los fungicidas cúpricos (hidróxido, oxiclóruo, óxido y sulfato) que resultaron casi inefectivos en el control de *Colletotrichum* (Rodríguez 2002). En otra investigación realizada para evaluar el efecto *in vitro* de diversos fungicidas sobre la inhibición de la germinación de esporas y en el crecimiento micelial de los hongos causantes de la pudrición del fruto de aguacate, entre ellos *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides*, se demostró que las formulaciones de hidróxido de cobre, hidrosulfuro de cobre y dithianon, inhiben efectivamente la germinación de esporas, pero no el crecimiento micelial de los hongos evaluados (Everett y Timudo 2007).

Sin embargo, todavía existe controversia en el tema (Mills *et al.* 1992) debido principalmente a la gran plasticidad que presenta este patógeno sobre todo en condiciones de cultivo *in vitro* (Sutton 1992, Guarro *et al.* 1999), en las cuales, puede presentar variaciones en su morfología (Du *et al.* 2005), que pueden ser provocadas por el efecto tóxico de los fungicidas (Abo y Sharaf 2003). Además, la influencia del medio ambiente en los rasgos culturales y la existencia de formas intermedias que pueden estar asociadas con almacenaje, estos criterios pueden no ser siempre apropiados para la confiable diferenciación de las especies, debido a que actualmente se conoce que un mismo hospedero puede ser atacado por más de una especie de *Colletotrichum*, así como que varios hospederos pueden ser atacados por una misma especie de este patógeno (Freeman 2000).

A pesar de esta controversia, el uso de fungicidas como el benomilo, para la caracterización de especies de *Colletotrichum*, ha sido una buena herramienta, que ha ayudado para mostrar que

C. gloeosporioides tiene una amplia variación genética cuando se toman en cuenta estos criterios, además, indica que es un patógeno que puede evolucionar rápidamente lo que le da mayor probabilidad de adaptarse más fácilmente a fungicidas o a hospederos resistentes (Freeman 2000).

Hoy en día la diferenciación de especies de *Colletotrichum* spp. , a nivel molecular, es una herramienta que nos proporciona certidumbre en cuanto a la identificación de especies de *Colletotrichum* se refiere. Para esto se han diseñado oligonucleótidos específicos del espaciador transcrito interno (ITS) de ADN ribosomal (Freeman *et al.* 2000, Abang *et al.* 2005, Abang *et al.* 2006), que ha sido usado para estimar la diversidad genética intraespecífica de *Colletotrichum gloeosporioides* (Freeman *et al.* 1996, Freeman *et al.* 1998), en combinación con el iniciador específico CgInt (5'-GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG-3') (Adaskaveg y Hartin 1997). En otro trabajo, Afanador *et al.* (2003), identificó a *C. gloeosporioides* en tamarilla, pasiflora y mango usando la combinación CgInt/ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT CG 3'), así también, Álvarez *et al.* (2005), caracterizó molecularmente a *C. gloeosporioides* usando la misma combinación de oligonucleótidos iniciadores para obtener un producto de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de aproximadamente 450 pb. Por otra parte, la especie *C. acutatum* ha conseguido ser caracterizada molecularmente usando la combinación de oligonucleótidos iniciadores CaInt2(5' GGG GAA GCC TCT CGC GG 3')/ITS4 con los que se consiguieron productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de aproximadamente 560 pb (Freeman *et al.* 2000, Freeman *et al.* 2001). Esta misma combinación fue usada por Peres *et al.* (2002), quien obtuvo productos de amplificación de entre 450 y 500 pb aproximadamente. Otros trabajos para la caracterización molecular de *C. acutatum* reportan la obtención de productos de PCR con un peso molecular de alrededor de 500 pb (Rivera 2006, Afanador *et al.* 2003, Talhinhos *et al.* 2005). Con el uso de estos oligonucleótidos específicos para caracterizar *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* se han detectado la presencia de estos patógenos en diversos hospederos, incluyendo aquellos en los que no había reportes de su existencia (Adaskaveg y Hartin 1997, Föster y Adaskaveg 1999, Freeman *et al.* 2001, Gutiérrez-Contreras 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizaron cepas de *Colletotrichum* spp., obtenidas del cepario de la Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología (UIAA), de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, elaborado por la Dra. Maribel Gutiérrez Contreras. En el Cuadro 1, se presenta la información sobre el origen de cada una de las cepas utilizadas en el presente trabajo de investigación. Así mismo, estas cepas fueron caracterizadas en cuatro grupos patogénicos (Gutiérrez 2008) (Cuadro 2), donde las cepas consideradas como más patogénicas fueron aquellas que provocaron una lesión en fruto mayor de 32.8 mm de diámetro y las menos patogénicas las que provocaron una lesión de 3.8 mm de diámetro. Dichas cepas, se obtuvieron empleando medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) marca Bioxon[®] adicionado con cloramfenicol (500 mg L⁻¹) marca Pfizer[®].

Las cepas provienen de ocho municipios del estado de Michoacán, México con características agroclimáticas homogéneas.

Multiplicación e identificación de cepas de *Colletotrichum* spp. La multiplicación del patógeno se hizo, extrayendo una alícuota de 30 µL de la solución con conidios, que se colocó en una caja petri con PDA. Una vez desarrollado el micelio, se extrajeron con un sacabocado estéril, discos del margen de la colonia del cultivo monospórico y se colocaron en nuevas cajas Petri conteniendo el medio de cultivo indicado adicionado con cloramfenicol (500 mg L⁻¹). La identificación del patógeno se hizo empleando las claves de Barnett y Hunter (1998) y la descripción de Simmonds (1965), Sutton (1992) y Smith y Black (1990). Para lo anterior, se hicieron preparaciones semipermanentes de micelio y conidios del hongo con lactofenol azul. Las estructuras desarrolladas por el hongo fueron observadas con la ayuda de un microscopio compuesto con campos de 100 X y 430 X.

Cuadro 1. Origen de las cepas de *Colletotrichum* spp., aisladas de frutos de aguacate.

No. de identificación	Nombre del huerto	Nombre del propietario	Municipio	Amsnm
3-AR	Pino Alto	Gildardo Orejel Tejeda	Ario	2218
7-LR	La Cruz	José Oseguera Mendoza	Los Reyes	1740
10-TC	La Tinaja	Trinidad Hinojosa	Tacámbaro	1855
13-PR	San Francisco	María Velázquez	Peribán	1720
22-TC	Tecario	Jesús Flores	Tacámbaro	1840
25-TN	Charapóndiro	Rafael Esquivel Montero	Tancítaro	1786
27-TC	Yoricostio	Pedro Juárez Ruíz	Tacámbaro	1980
28-TN	El Jaral	Jesús Zamora Madrigal	Tancítaro	1721
29-TN	Agua Fría	Bulmaro Sánchez Armas	Tancítaro	1710
31-TN	El Capulín	Jesús Rodríguez Estrella	Tancítaro	1868
33-TN	La Majadita	Jesús Bucio Cortes	Tancítaro	1788
35-TN	Charapóndiro	Rafael Esquivel Montero	Tancítaro	1786
37-TN	La Terronera	Eloisa González Márquez	Tancítaro	1966
38-TR	La Mesa	José Luis Mendoza	Taretán	1800
40-TG	El Timbinal	Jaime Treviño García	Tingambato	1856
44-TG	El Timbinal	Luis Manuel Salgado Gutiérrez	Tingambato	2019
45-TG	El Paraje	José Luis Gudiño Alcaraz	Tingambato	1957
47-TG	Los Magueyes	Daniel Gudiño Alcaraz	Tingambato	1834
48-AR	El Timbinal	Bulmaro Sánchez Armas	Ario	2145
57-TI	Tingüindín	Jaime Porres Uñigo	Tingüindín	1750

Cuadro 2. Grupos patogénicos, origen e identidad de las cepas de *Colletotrichum* spp., aisladas de aguacate.

Cepa	Identidad	Grupo patogénico	Cepa	Identidad	Grupo patogénico
3-AR	<i>C. gloeosporioides</i>	3	33-TN	<i>C. gloeosporioides</i>	1
7-LR	<i>C. gloeosporioides</i>	3	35-TN	<i>C. acutatum</i>	2
10-TC	<i>C. acutatum</i>	1	37-TN	<i>C. gloeosporioides</i>	4
13-PR	<i>C. gloeosporioides</i>	3	38-TR	<i>C. gloeosporioides</i>	2
22-TC	<i>C. gloeosporioides</i>	1	40-TG	<i>C. gloeosporioides</i>	3
25-TN	<i>C. gloeosporioides</i>	2	44-TG	<i>C. gloeosporioides</i>	4
27-TC	<i>C. gloeosporioides</i>	4	45-TG	<i>C. gloeosporioides</i>	2
28-TN	<i>C. gloeosporioides</i>	3	47-TG	<i>C. gloeosporioides</i>	4
29-TN	<i>C. gloeosporioides</i>	2	48-AR	<i>C. gloeosporioides</i>	1
31-TN	<i>C. gloeosporioides</i>	4	57-TI	<i>C. acutatum</i>	1

AR= Ario; LR= Los Reyes; PR= Peribán; TC= Tacámbaro; TN= Tancítaro; TR= Taretan; TG= Tingambato; TI= Tingüindín.

Caracterización morfología de *Colletotrichum* spp. La caracterización morfológica de las cepas se hizo utilizando discos de 10 mm de diámetro de cultivos monospóricos puros, en cajas petri conteniendo PDA (Bioxon®). Se utilizaron dos cajas por cepa y a una temperatura de 24 °C ± 1 (Adaskaveg y Hartin 1997), bajo condiciones de oscuridad continua, hasta que la primera cepa llenó el espacio de la caja. Las características evaluadas en la colonia fueron: color, textura de micelio y presencia de anillos concéntricos y estrías. En el primer caso se determinó la coloración que presentaba el micelio al anverso, al reverso y el centro de la colonia con base en las cartas de color de suelo de Munsell (1975). La textura (algodonosa, afelpada o fieltro, granulosa) del micelio se determinó de acuerdo a las descritas por Sutton (1992), Alexopoulos y Mims (1985) y Orozco *et al.* (2004). La formación o no de anillos concéntricos fue determinada de manera visual por la diferencia de coloración de la colonia y la formación de estrías fue determinada en base a la presencia de surcos longitudinales en la colonia. Otras de las características evaluadas fueron: presencia y color de masas conidiales,

forma y tamaño de los conidios. La forma de los conidios, fue determinada con base en la descripción de Smith y Black (1990), Sutton (1992) y Adaskaveg y Hartin (1997); para ello, se hicieron montajes semipermanentes con lactofenol azul. El tamaño de conidios (TC_{1-d}) fue determinado como el producto de la relación longitud y diámetro en la parte media de la espora (Tamaño=longitud/diámetro), empleando un microscopio compuesto (Carl Zeiss) en campo de 430X.

Tasa de crecimiento de la colonia. La tasa de crecimiento (T_{crec}), de las colonias fue evaluada tomando en consideración el diámetro de crecimiento de las colonias cada 12 horas, hasta que la primera cepa cubrió el espacio de la caja Petri. La tasa de crecimiento (mm), se obtuvo mediante la siguiente relación: $T_{\text{crec}} = (D_f - D_i) / T$, en donde: D_f = diámetro final de crecimiento de la colonia, D_i = diámetro inicial (disco de PDA con micelio) y T = tiempo total en días.

Análisis de la información. Los datos obtenidos de las variables T_{crec} y TC_{1-d} fueron sometidos a un análisis de varianza de una sola vía con el procedimiento Fit Y by X del paquete computacional de estadística JMP del SAS Institute versión 7. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($p=0.05$ y 0.001). Además, las variables cuantitativas indicadas se sometieron a un análisis de conglomerados, empleando el paquete estadístico JMP del SAS Institute versión 7. El resto de las características morfológicas fueron analizadas de manera cualitativa.

Determinación de la dosis efectiva media (ED_{50}) de *Colletotrichum* spp. Se hizo un ensayo *in vitro*, con cuatro fungicidas en distintas dosis para determinar la ED_{50} (dosis efectiva media) a emplear en el bioensayo de sensibilidad, para lo cual se llevó a cabo un experimento con una cepa de *C. gloeosporioides* y una de *C. acutatum*, ante la acción de cada uno de los fungicidas (Cuadro 3). Preparadas las soluciones se procedió a colocar en el centro de una caja petri con medio de cultivo PDA, un disco de papel filtro estéril Whatman® calibre 44 de 8 mm de diámetro, impregnado con 30 μL de una solución de conidios de 1×10^5 obtenidos de masas conidiales o por remoción más micelio. El disco en el centro fue rodeado en forma equidistante por cuatro discos de papel filtro estéril (mismo calibre), impregnados con 50 μL de la concentración a emplear del fungicida (Dhingra y Sinclair 1995). Este procedimiento se repitió con cada una de las concentraciones de los diferentes fungicidas. Por último, las cajas

con las cepas tratadas se incubaron a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ y su crecimiento micelial fue medido cada 12 h.

Cuadro 3. Fungicidas y dosis empleadas para la determinación de la ED₅₀ de cepas de *Colletotrichum* spp.

Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis
Califa	Benomilo	0.4 g L ⁻¹
		0.2 g L ⁻¹
		0.1 g L ⁻¹
		0.0 g L ⁻¹
Manzate 200	Mancozeb	2.5 g L ⁻¹
		1.25 g L ⁻¹
		0.625 g L ⁻¹
		0.0 g L ⁻¹
Cupravit	Oxicloruro de cobre	3.0 g L ⁻¹
		1.5 g L ⁻¹
		0.75 g L ⁻¹
		0.0 g L ⁻¹
Flow Pet	Folpet	2.0 mL L ⁻¹
		1.0 mL L ⁻¹
		0.5 mL L ⁻¹
		0.0 mL L ⁻¹

Bioensayo de sensibilidad *in vitro* de *Colletotrichum* spp. Con la ED₅₀ determinada se hizo el bioensayo de sensibilidad, en el cual se siguió la misma metodología que el experimento donde se determinó dicha dosis, con la diferencia del empleo de esta única concentración determinada tanto como para la especie de *C. gloeosporioides*, como para la especie de *C. acutatum*.

Determinación de medios de cultivo a emplear para la cosecha de micelio de *Colletotrichum* spp. Para el desarrollo de trabajo, se multiplicaron cepas en cajas petri con

medio de cultivo PDA (38 g L⁻¹), donde se colocó papel encerado y estéril con la finalidad de facilitar la cosecha de micelio libre de medio de cultivo. La otra parte del trabajo, consistió en elevar la concentración de PDA a 43 g L⁻¹, con la finalidad de cosechar micelio libre de medio de cultivo a consecuencia de la mayor firmeza del medio.

Extracción de ADN de *Colletotrichum* spp. Para la extracción de ADN se colectó micelio fresco de 48 a 72 h de crecimiento. El micelio fue cosechado directamente de las cajas petri con medio de cultivo PDA. Posteriormente el micelio cosechado fue congelado en nitrógeno líquido y macerado hasta obtener un polvo fino empleando mortero y pistilo fríos.

Posteriormente se colocaron aproximadamente 25 mg de micelio macerado en un tubo Eppendorf® de 2 mL y se agregaron 500 µL de regulador de lisis (Tris-HCl pH 8.5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS al 0.5%) y tras mezclar mediante agitación en un vortex por 10 minutos se extrajo con 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50: 49: 1 v/v) y se centrifugo a 12,000 rpm en una microcentrífuga por 30 min a 4 °C. La fase acuosa fue transferida a nuevos tubos y se extrajo una vez más con la mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50: 49: 1 v/v) y se centrifugo durante 10 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a nuevos tubos eppendorf conteniendo 500 µL de cloroformo para después mezclar en vortex y centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Una vez más, se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos y se agregó 0.5 volúmenes (500 µL) de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Luego se desecho el sobrenadante y se seco la pastilla para eliminar el exceso de isopropanol. Después, la pastilla se resuspendió en 40 µL de agua desionizada estéril. Una vez resuspendida se le agregaron 2 µL de ARNasa (10 mg mL⁻¹) y se incubo durante 30 minutos a 37 °C. Para corroborar la presencia de ADN en cada uno de los tubos, se tomo una alícuota de 3 µL más 1 µL de buffer de carga (SGB) y se cargó en un gel de agarosa al 1 % a 80 volts durante 75 minutos. Para visualizar el ADN, el gel se tiño con bromuro de etidio (0.4 µg mL⁻¹) durante 15 minutos, para después lavarse por 5 minutos con dH₂O. Y por último se observó en un transiluminador de rayos UV marca Amersham Biosciences®.

Detección de *Colletotrichum* spp., mediante el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento correspondiente a la secuencia del transcrito interno (ITS1)/ARNr 5.8S se amplificó, mediante algunas modificaciones hechas al protocolo descrito por Cano *et al.* (2004), utilizando los oligonucleótidos Col-F (5' AAC CCT TTG TGA ACA

TAC CT 3') y Col-R (5' CCA CTC AGA AGA AAC GTC GTT 3') diseñados para distinguir aislados de *Colletotrichum* de otros hongos, incluyendo especies patogénicas comunes (Cuadro 4).

Cuadro 4. Componentes de la reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos ColF y ColR, diseñados para distinguir el género *Colletotrichum* de otros hongos.

Reactivo	μL
ddH ₂ O	17.0
Buffer <i>taq</i> 10 ^x	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.0
dNTP's (2.5 mM)	1.0
Iniciador Col-F (10 μM)	1.0
Iniciador Col-R (10 μM)	1.0
Enzima ADN <i>Taq</i> polimerasa	0.5
ADN del hongo	1.0

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Techne TC-412 con el siguiente programa: 94 °C durante 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización (94 °C por 1 min); alineamiento (50 °C por 1 min); extensión del ADN (72 °C por 2 min) y 72 °C durante 10 minutos. Seguido de la amplificación, los productos de PCR (6 μL/2 μL de colorante SGB) y el marcador molecular ADN Ladder de 100 pb (1 μL/2 μL de SGB), fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 60 volts durante 75 minutos y se tiñó con bromuro de etidio (0.4 μg mL⁻¹) para ser observado en un transiluminador de luz UV.

Detección de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* mediante el ensayo de PCR. Para la amplificación del ITS4 de ADNr de *C. gloeosporioides* se utilizó la combinación específica CgInt (5' GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG 3')/ITS4; y para *C. acutatum* la combinación específica CaInt2 (5' GGG GAA GCC TCT CGC GG 3')/ITS4, de acuerdo a las condiciones descritas por Adaskaveg y Hartin (1997); y Talhinhos *et al.* (2002) modificado respectivamente (Cuadro 5). La reacción de amplificación para *C. gloeosporioides* con la combinación CgInt/ITS4, se llevó nuevamente a cabo en un termociclador Techne TC-412 con el siguiente programa: 94 °C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de

desnaturalización (94 °C por 1 min); alineamiento (59 °C por 2 min); extensión del ADN (72 °C por 2 min) y 72 °C durante 5 minutos (Adaskaveg y Hartin 1997). En el caso de *C. acutatum*, la reacción de amplificación se hizo con la combinación de oligonucleótidos CaInt2/ITS4 siguiendo el programa: 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 30 s); alineamiento (62 °C por 30 s); extensión del ADN (72 °C por 2 min) y 72 °C durante 7 minutos (Talhinhas *et al.* 2002 modificado). Finalmente, los productos de PCR (6 µL/2 µL de colorante SGB) y el marcador molecular ADN Ladder de 100 pb (1 µL/2 µL de SGB), fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % a 60-80 volts durante 75 minutos. Para visualizar los productos de PCR los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.4 µg mL⁻¹) y se observaron en un transiluminador de luz UV.

Cuadro 5. Componentes de la reacción de amplificación utilizando la combinación de oligonucleótidos CgInt/ITS4 y CaInt2/ITS4, para la identificación de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* respectivamente.

Reactivo	µL
ddH ₂ O	16.5
Buffer <i>taq</i> 10 ^x	2.0
MgCl ₂ (50 mM)	1.0
dNTP's (2.5 mM)*	2.0
Iniciador CgInt/CaInt2 (10 µM)	1.0
Iniciador ITS4 (10 µM)	1.0
Enzima ADN <i>Taq</i> polimerasa	0.5
ADN extraído	1.0

*En la amplificación para *C. acutatum*, se utilizaron en una concentración de 2.0 mM

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Coloración de la colonia. Al anverso de la colonia se crearon cuatro grupos de cepas: 1) blanco, 2) gris, 3) gris claro y 4) gris olivo; con el 5 %, 65 %, 25 % y 5 % respectivamente. Respecto de la coloración al reverso, esta presentó mayor variación, formándose cinco grupos; donde la coloración predominante fue gris con un 50 %; seguido de las coloraciones crema y crema rosado con un 20 % para cada una y por último la coloración gris olivo y marrón con 5

% cada una. En relación a la coloración del centro de la colonia, el color predominante fue el gris oscuro (70 %), además de la coloración gris (20 %) y gris olivo (10 %). En la Figura 1, se presentan los histogramas de frecuencia para color de colonia en el anverso, reverso y centro.

Las características de coloración determinadas en las cepas analizadas muestran la variabilidad existente entre ellas, aunque estos tipos de caracteres no son determinantes para diferenciar especies. Lo anterior es debido, probablemente, a que el género *Colletotrichum*, presenta una gran heterogeneidad morfológica en condiciones de cultivo, como lo determinan diversos estudios hechos en colectas de este patógeno, procedentes de varios cultivos (Smith y Black 1990, Denoyes y Braudry 1995, Adaskaveg y Hartin 1997, Talhinhos *et al.* 2005, Du *et al.* 2005, Gutiérrez 2008).

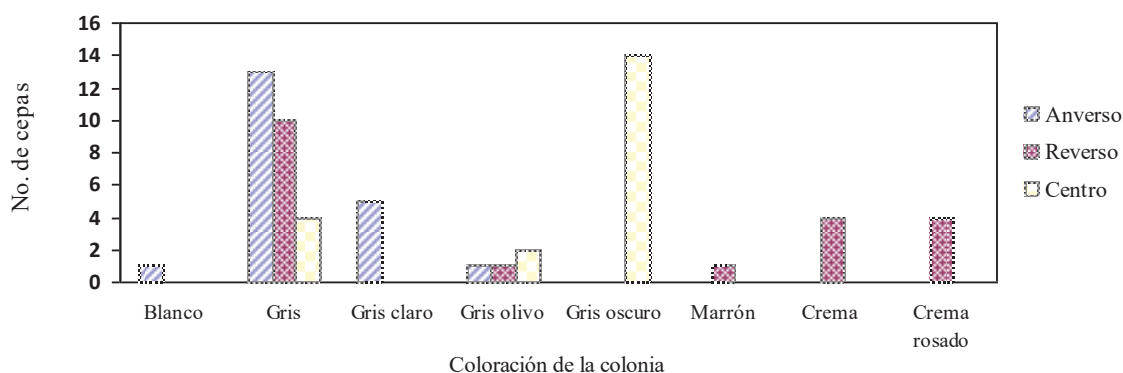


Figura 1. Histograma de frecuencias para la coloración de las colonias de *Colletotrichum* spp., aislado de frutos de aguacate en Michoacán.

Textura del micelio y forma de la colonia. La textura del micelio fue algodonosa en el 70 % de las cepas estudiadas, el resto presentaron micelio afelpado o tipo fieltro, ligeramente granuloso principalmente al centro de la colonia (Figura 2). Respecto a la forma de la colonia, la mayoría de las cepas exhibieron una forma circular y en algunos casos (25 %) circular con pequeñas ondulaciones; esta última característica estuvo relacionada con las cepas que presentaron micelio con una consistencia fieltro (Figura 3).



Figura 2. Textura observada en cepas de *Colletotrichum* spp., aislado de frutos de aguacate de Michoacán: textura tipo algodónosa (A) y textura tipo fieltro (B).

Formación de anillos concéntricos y estrías. De las 20 cepas evaluadas, 3 presentaron círculos concéntricos (Figura 4), mientras que las 17 restantes no formaron círculos o anillos concéntricos. La formación de estrías fue una característica ausente en todas las cepas. Estas características se pueden observar en trabajos descriptivos similares.

Características de conidios. De las 20 cepas estudiadas, solo seis presentaron sus conidios en masas, lo que equivale al 30 % del total de las cepas estudiadas, de donde, el 100 % de las masas conidiales presentaron una coloración naranja. En cuanto a la forma de los conidios, la cilíndrica con ambos ápices obtusos fue la más frecuente (70 %), el resto de las cepas presentaron conidios fusiformes con ambos ápices agudos. En lo que respecta al TC_{1-d} , los conidios con forma cilíndrica y ápices obtusos, presentaron tamaños que oscilan de 2.4 a 5.0 μm y, no así para el caso de los conidios fusiformes, donde la variación fue entre 2.7 y 3.7 μm .



Figura 3. Forma de crecimiento ondulado (A) y circular (B) observado en cepas de *Colletotrichum* spp., aisladas de frutos de aguacate.

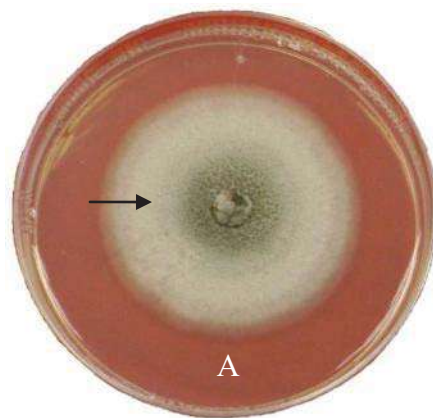


Figura 4. Anillos concéntricos (A) presentes en *Colletotrichum* spp., aislado de frutos de aguacate cultivado en Michoacán.

La forma cilíndrica con ápices obtusos, corresponde (Smith y Black 1990, Adaskaveg y Hartin 1997, Freeman *et al.* 2002, Gutiérrez *et al.* 2002, Du *et al.* 2005, Gutiérrez 2008, Rivera-Vargas *et al.* 2006) a los típicos de *C. gloeosporioides*. Los conidios fusiformes con ambos ápices agudos son reportados como una característica morfológica distintiva de *C. acutatum* (Smith y Black 1990, Sutton 1992, Du *et al.* 2005, Orozco-Santos *et al.* 2004). De la misma manera, el menor tamaño determinado en los conidios fusiformes es muy aproximado a lo reportado por Simmonds (1965) y Sutton (1992) para esta especie.

En cuanto al TC_{1-d} no se encontró una relación directa entre estos parámetros que permitan una diferenciación determinante entre las dos especies. De acuerdo con resultados obtenidos en trabajos similares y en el presente, el TC_{1-d} solo representa la variabilidad del hongo (Sutton 1992, Adaskaveg y Hartin 1997, Freeman *et al.* 2002, Smith y Black 1990, Gutiérrez *et al.* 2002, Gutiérrez 2008, Du *et al.* 2005, Rivera *et al.* 2006, Afanador *et al.* 2003, Smith y Black 1990, Freeman y Katan 1997, Lewis *et al.* 2004), pero debido a la variación del TC_{1-d} determinado para cada especie, es comprometido considerar este carácter como determinante para la diferenciación de especies de *Colletotrichum* (Freeman *et al.* 1998). El dendograma de encadenamiento completo generado a partir del análisis de conglomerados para TC_{1-d} que se presenta en la Figura 5, muestra el grado de similitud entre las 20 cepas respecto al TC_{1-d} , mostrando la formación de tres grupos. Las cepas 3-AR, 7-LR y 10-TC presentaron un tamaño mayor de conidios con respecto de las cepas 29-TN y 48-AR que fueron las que exhibieron el menor tamaño de conidios, quedando entre estos dos grupos las 15 cepas restantes. Con base en lo anterior, éste carácter no es útil para la identificación y diferenciación de especies debido a la variación del TC_{1-d} ; además de no encontrar relación alguna entre este carácter y el grupo patogénico al que pertenecen las cepas.

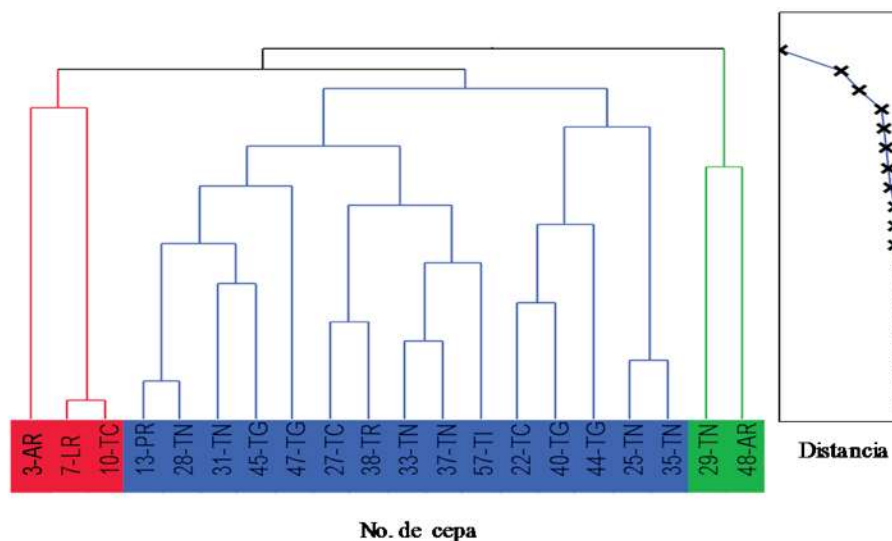


Figura 5. Dendrograma de encadenamiento completo para tamaño de conidios (TC_{1-d}) de *Colletotrichum* spp.

Tasa de crecimiento. Los análisis de varianza para esta variable indicaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.0001$). Los diámetros promedio de las 20 cepas evaluadas fluctuaron entre 4.5 y 19.0 mm, con una T_{crec} por día de -0.875 a 2.75 mm, respectivamente. La comparación de medias con base en la prueba de Tukey ($p = 0.0001$) indicó la formación de 8 grupos de cepas. Las cepas 37-TN, 13-PR, 47-TG y 7-LR presentaron la mayor T_{crec} , en contraste con las cepas 10-TC, 25-TC, 35-TC y 57-TC con menor diámetro. La menor T_{crec} de las colonias de *C. acutatum*, es considerada también como una característica distintiva de esta especie respecto de *C. gloeosporioides* (Simmonds 1965, Sutton 1992, Freeman 2000); por lo anterior, las cepas que presentan una tasa de crecimiento menor, además de conidios fusiformes, que corresponden a *C. acutatum*. El análisis de conglomerados hecho para T_{crec} de las 20 cepas, generó tres grupos definidos como se muestra en la Figura 6. El primer grupo está formado por doce cepas caracterizadas morfológicamente como *C. gloeosporioides*; el segundo grupo se constituyó con seis cepas, donde cuatro de ellas son de *C. gloeosporioides* y dos pertenecen a *C. acutatum*. Y por último un tercer grupo con dos cepas, donde una pertenece a *C. gloeosporioides* y la otra a *C. acutatum*. Estos resultados comparados con el grupo patogénico al que pertenece cada una de las cepas, indica que no existe relación alguna entre la T_{crec} y la patogenicidad al encontrar que un solo grupo asocia cepas de los cuatro distintos grupos patogénicos.

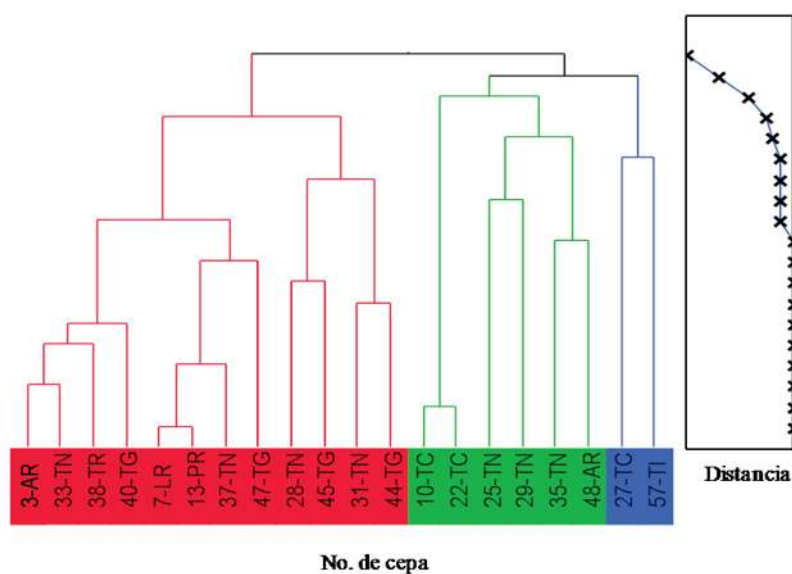


Figura 6. Dendrograma generado para tasa de crecimiento (T_{crec}) de las 20 cepas de *Colletotrichum* spp.

Con base en las descripciones morfológicas para las especies *C. gloeosporioides* (Sutton 1992, Martínez y Zambrano 1994, Martín y García 1999, Afanador *et al.* 2003, Smith y Black 1990, Du *et al.* 2005, Freeman *et al.* 1998) y *C. acutatum* (Du *et al.* 2005, Adaskaveg y Hartin 1997, Talhinhos *et al.* 2005, Lewis *et al.* 2004, Peres *et al.* 2005, Orozco *et al.* 2004) y al hacer el análisis comparativo con el conjunto de las distintas variables fenotípicas consideradas en este estudio, se corrobora la presencia de la especie *Colletotrichum acutatum*, además de *C. gloeosporioides*, atacando frutos de aguacate en Michoacán, México. Algunas características que fundamentan la determinación de la presencia de *C. acutatum*, son: la forma (fusiformes) de los conidios (Simmonds 1965, Sutton 1992, Walker *et al.* 1991, Kim *et al.* 1999, Du *et al.* 2005), color (crema salmón) de la colonia al reverso (Smith y Black 1990, Adaskaveg y Hartin 1997, Lewis *et al.* 2004, Talhinhos *et al.* 2005, Du *et al.* 2005) y textura (afelpada o fieltro, ligeramente granulosa) del micelio (Orozco-Santos *et al.* 2004), además de la T_{crec} de una colonia menor (Simmonds 1965, Sutton 1992, Freeman 2000).

Determinación de la ED₅₀ de benomilo. Ambas especies; *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, presentaron un crecimiento medio en PDA ante la concentración de 0.2 g L⁻¹, a diferencia de la concentración de 0.4 g L⁻¹ que permitió el crecimiento de las cepas de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* en un 40.00 y 45.58 %, respectivamente. Por otra parte, la dosis de 0.1 g L⁻¹ permitió un crecimiento de 58.82 % para *C. gloeosporioides* y de un 72.5 % para *C. acutatum*. La evaluación para cada una de las especies fue hecha en distintos tiempos con base en la velocidad de crecimiento que tiene cada una de ellas en medio de cultivo PDA. Sin embargo, estas especies presentaron un comportamiento similar de crecimiento en la concentración indicada.

Inhibición *in vitro* de *Colletotrichum* spp., en presencia de benomilo. Los resultados obtenidos en el experimento de sensibilidad muestran diferencias significativas (<0.0001) (Cuadro 1A) entre las 20 cepas ante la ED₅₀ de benomilo, las cepas 27-TC, 38-TR, 7-LR, 45-TG, 13-PR, 40-TG, 33-TN y 3-AR identificadas como *Colletotrichum gloeosporioides*, mostraron una mayor inhibición, la cual oscila entre 93.78 y el 66.66 %. En contraste las cepas identificadas como *C. acutatum* (10-TC, 57-TI y 25-TN) mostraron una inhibición que oscila entre 42.85 y 19.91 %. Estos resultados coinciden con los reportados por Adaskaveg y Hartin (1997) señalan a *C. gloeosporioides*, como una especie más sensible a la acción del benomilo, a diferencia de *C. acutatum*, la cual se reporta como una especie menos sensible a la acción de

este fungicida. Con respecto a la diversidad genética, se puede apreciar que varias de las cepas muestran porcentajes de inhibición distintos ante benomilo, a excepción de las cepas 7-LR y 45-TG; 33-TN y 3-AR; 28-TN y 44-TG; y por último 29-TN y 35-TN que exhiben una similitud en su comportamiento *in vitro*, lo cual puede deberse a la especie a la que pertenecen (*C. gloeosporioides*), aunque su origen es distinto. Las cepas restantes muestran diferencias entre sí, lo que indica la posibilidad de que cada una de ellas sea genéticamente distinta una de la otra, con base en los resultados del porcentaje de inhibición que muestra cada una de ellas.

Sin importar el grupo patogénico, la sensibilidad al fungicida benomilo de cada una de las cepas, continúa indicando que la especie *C. gloeosporioides* es más sensible (Maymon *et al.* 2006, Everett *et al.* 2005), mostrando una inhibición de su crecimiento micelial de hasta un 93.78 %, mayor porcentaje que el reportado por Peres *et al.* (2002), que obtiene un porcentaje de inhibición del área de la colonia de 12 a 32 % con una dosis de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, señalando además, que el incremento del fungicida benomilo por arriba de esta dosis inhibe totalmente el crecimiento de *C. gloeosporioides*. Otro trabajo, hecho con la técnica de antibiograma, cita un radio de inhibición de 14.7 a 19.0 mm (Adaskaveg y Hartin 1997). Respecto a *C. acutatum*, los resultados la señalan como una especie con una menor sensibilidad a dicho fungicida (Freeman *et al.* 1998, Peres *et al.* 2001), tal y como ocurre con cepas aisladas de otros cultivos como fresa, durazno y almendro entre otros, donde reduce el tamaño de la colonia de un 60 a un 70 % utilizando una dosis de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, además de un radio de inhibición de 1.4 a 8.3 mm (Peres *et al.* 2002, Adaskaveg y Hartin 1997). La respuesta de los grupos patogénicos ante benomilo fue distinta entre ellos. Sin embargo, el primer y segundo grupo exhibieron un promedio de inhibición de 41.87 y 47.60 %, respectivamente; y una variación entre sus cepas desde 19.91 hasta 73.61 %. Por otro lado, el tercer y cuarto grupo patogénico presentaron un porcentaje promedio de inhibición del 67.24 y 68.92 % respectivamente, habiendo entre sus cepas comprendidas un porcentaje de inhibición que va de 57.81 % hasta 93.78 %. Un tercer grupo presenta una variación de 7.10 hasta 17.27 % con un promedio de 12.92 %. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la sensibilidad no se encuentra relacionada con el grupo patogénico, el cual está determinado por severidad de la lesión que es capaz de provocar el patógeno. Sin embargo, las diferencias en la inhibición mostradas por cada una de las cepas, sugiere que existen diferencias genéticas entre las cepas evaluadas, lo cual se

observa en la respuesta de crecimiento mostrado por las distintas cepas en presencia del fungicida benomilo.

En la Figura 7, se presenta una fotografía en donde se observa el efecto diferencial en la sensibilidad de las cepas de *Colletotrichum* ssp., al fungicida benomilo. *C. acutatum* presentó una menor sensibilidad al fungicida en promedio.

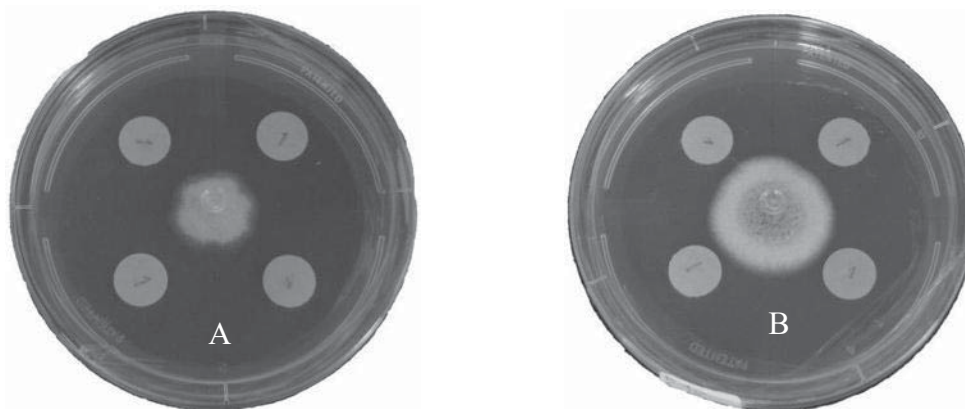


Figura 7. Inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* (40-TG) (A) y *C. acutatum* (10-TC) (B) ante la ED₅₀ de benomilo.

Determinación de la ED₅₀ de mancozeb. Ambas especies; *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, presentaron un crecimiento intermedio en PDA ante la dosis de 1.25 g L⁻¹ para mancozeb; a diferencia de la dosis de 2.5 g L⁻¹ que permitió el crecimiento de las cepas de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* en un 37.33 y 40.56 % respectivamente. Por otra parte, la dosis de 0.625 g L⁻¹ permitió un crecimiento de 62.66 % para *C. gloeosporioides* y de 64.15 % para *C. acutatum*. La evaluación para cada una de las especies se hizo en distintos tiempos, esto a causa de la velocidad de crecimiento que tiene cada una de ellas en medio de cultivo PDA. Sin embargo, estas especies presentaron un comportamiento similar de crecimiento en las dosis indicadas.

Inhibición *in vitro* de *Colletotrichum* spp., en presencia de mancozeb. Los resultados obtenidos en el experimento de sensibilidad muestran diferencias significativas (<0.0001) (Cuadro 2A) con respecto al comportamiento de las 20 cepas ante la ED₅₀ de mancozeb, las

cepas 7-LR, 37-TN, 28-TN, 13-PR, 47-TG y 29-TN, todas ellas identificadas como *C. gloeosporioides* mostraron una mayor inhibición que oscila entre 11.90 y 17.27 %. En contraste las cepas 33-TN, 3-AR, 35-TN, 22-TC, 31-TN, 45-TG, 10-TC, 40-TG, y 38-TR, donde la cepa 10-TC identificada como *C. acutatum*, tuvo un comportamiento similar al resto identificadas como *C. gloeosporioides*. En general este grupo de cepas presentó una inhibición entre 5.55 y 11.11 %; y por último, las cepas 25-TN, 44-TG, 27-TC, 57-TI, y 48-AR exhibieron un porcentaje de inhibición entre 5.35 y 0.00. Entre este grupo de cepas, la 25-TN y 57-TI fueron identificadas como *C. acutatum* con base en el estudio morfológico, lo cual apoya los resultados mostrados ante benomilo (Adaskaveg y Hartin 1997), que señalan a *C. gloeosporioides* como una especie más sensible a la acción de los fungicidas (Figura 8). Sin embargo, en el presente estudio ambas especies de *Colletotrichum* muestran poca sensibilidad ante mancozeb, lo que coincide con trabajos hechos en el control químico de la aceituna jabonosa (Rodríguez 2002). Caso contrario, Sánchez (1994), hizo un estudio *in vitro* para el control de la antracnosis empleando benomilo + mancozeb, el cual demostró ser el segundo mejor tratamiento en la inhibición de *Colletotrichum*; sin embargo, estos resultados también se obtuvieron *in vitro*, en otro trabajo, donde mancozeb inhibe hasta en un 88 % el crecimiento de *Colletotrichum* spp. (Gutiérrez *et al.* 2006). Con respecto a la diversidad genética, se puede apreciar que casi todas las cepas muestran porcentajes de inhibición distintos entre sí, a excepción de la cepa 3-AR y la cepa 33-TN que exhiben una similitud en su comportamiento *in vitro*, que puede deberse a la especie que pertenecen, aunque su origen es distinto, ya que la primera pertenece al municipio de Ario y la segunda al municipio de Tancítaro. Las 18 cepas restantes muestran diferencias entre sí, lo que revela la posibilidad de que cada una de ellas es genéticamente distinta en base a los resultados del porcentaje de inhibición que manifiestan cada una de ellas.

La respuesta de los grupos patogénicos ante mancozeb fue distinta entre ellos. El primero, exhibió un menor promedio de inhibición con 5.78 % y una variación entre sus cepas desde 0.00 hasta 11.11 %. El segundo grupo patogénico presentó un porcentaje de 8.51 % con variación entre 5.35 y 11.90 %. El grupo tres presenta variación de 7.10 hasta 17.27 % con un promedio de 12.92 %. Este grupo fue el que mayor inhibición mostró, además de coincidir con ser uno de los grupos más patogénicos. Por último, las cepas del cuarto grupo patogénico mostraron una inhibición promedio de 9.40 %, misma que osciló desde 4.02 hasta 13.15 %.

Estos resultados coinciden con los obtenidos con benomilo, los cuales señalan que la sensibilidad no está relacionada con el grupo patogénico, el cual se determina por severidad de la lesión que es capaz de provocar el patógeno.



Figura 8. Inhibición de crecimiento de *C. gloeosporioides* (A) y *C. acutatum* (B) ante la ED₅₀ de mancozeb.

Determinación de la ED₅₀ de oxiclورو de cobre. *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, presentaron un crecimiento intermedio empleando la concentración de 1.5 g L⁻¹ de oxiclورو de cobre.

Inhibición *in vitro* de *Colletotrichum* spp., en presencia de oxiclورو de cobre. Los resultados obtenidos en el experimento de sensibilidad muestran diferencias significativas (<0.0004) (Cuadro 3A) con la formación de 3 grupos. Respecto al comportamiento de las 20 cepas ante la ED₅₀ de oxiclورو de cobre, las cepas 27-TC, 37-TN, 28-TN y 7-LR identificadas como *C. gloeosporioides* mostraron una mayor inhibición, la cual oscila entre 14.61 y 19.50 %; mientras que las cepas 40-TG, 38-TR, 3-AR, 10-TC, 47-TG, 13-PR, 29-TN, 31-TN, 35-TN, 25-TN, 48-AR, 22-TC y 33-TN expresaron una inhibición entre 5.55 y 12.82 %, destacando dentro de estas la presencia de las cepas 10-TC y 25-TN identificadas como *C. acutatum* con base en el estudio morfológico hecho en el presente trabajo, ya que su inhibición coincide con la de las demás cepas caracterizadas como *C. gloeosporioides*; y por último, las

cepas 57-TI, 44-TG y 45-TG exhibieron un porcentaje de inhibición entre 3.33 y 0.00, en donde la cepa 57-TI, pertenece a la especie *C. acutatum*.

Estos resultados concuerdan con otros donde se señala que *Colletotrichum* muestra una inhibición no mayor del 20 % frente a oxiclورو de cobre (Gutiérrez *et al.* 2006). Además, Rodríguez (2002) señala que los fungicidas cúpricos (hidróxido, oxiclورو, óxido y sulfato) son casi inefectivos en el control de especies de *Colletotrichum*, lo cual se puede deber a que este tipo de fungicidas solo inhiben la germinación de esporas, más no el crecimiento micelial (Everett y Timudo 2007).

En relación a los grupos patogénicos y su promedio de inhibición, podemos citar que el primero de ellos mostró un porcentaje de 6.42, con un rango que va de 3.33 hasta 10.71 %; mientras que el segundo exhibió un promedio de 5.59 con una variación de 0.00 hasta 11.11 %. Las cepas del tercer grupo fueron las que mayor promedio de inhibición tuvieron, el cual fue de 12.75% y una oscilación de sus valores que va de 10.52 hasta 14.70 %. Por último, el cuarto grupo tuvo un porcentaje promedio de inhibición de 11.65 con valores que van desde 3.12 hasta 19.50 %. A pesar de ser este último grupo en el que se encuentran las cepas que mayor sensibilidad mostraron a oxiclورو de cobre, queda como segundo lugar después del tercer grupo patogénico en el que sus cepas mostraron mayor sensibilidad con un porcentaje promedio de 12.75 %. Con los resultados anteriores podemos deducir que la sensibilidad de las especies de *Colletotrichum* no se encuentra relacionada con el grupo patogénico de ellas, el cual se determinó por la severidad de la lesión provocada. Además, las diferencias exhibidas por las cepas sugieren que existen también diferencias genéticas por la respuesta de crecimiento mostrado ante oxiclورو de cobre, donde las cepas de *C. gloeosporioides* se caracterizaron por ser más sensibles, mientras que las de *C. acutatum* mostraron una menor sensibilidad (Figura 9), ante este fungicida. Trabajos realizados por McHargue y Calfee (1931), Steinberg (1936) y Javillier (1939) (citado por Romero 1993), han demostrado la esencialidad del cobre para el desarrollo normal de los hongos. Sin embargo, también se indica que aunque el cobre es un elemento esencial, también es el ingrediente activo de muchos fungicidas, por consiguiente, la concentración de este elemento debe tomarse muy en cuenta al estudiar sus efectos sobre el desarrollo de ciertos hongos fitopatógenos. Además, debe considerarse el fenómeno de antagonismo iónico, pues el efecto de una cantidad determinada de cobre depende de los demás ingredientes del medio de cultivo.



Figura 9. Inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (A) y *C. acutatum* (B) ante la ED₅₀ de oxiclورو de cobre.

Determinación de la ED₅₀ de folpet. Las especies de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, presentaron un 50 % de crecimiento ante la concentración de 1.0 g L⁻¹, lo que difiere con la concentración de 2.0 g L⁻¹, donde *C. gloeosporioides* exhibió un crecimiento de 43.75 %, mientras que *C. acutatum* presentó un crecimiento más elevado, con un 46.22 %. Por otra parte, los resultados obtenidos con el empleo de la concentración de 0.5 g L⁻¹ nos muestran que *C. gloeosporioides* tuvo un crecimiento de 57.81 %, diferente para *C. acutatum*, donde su crecimiento fue de 60.37 % ante la dosis mencionada. La evaluación de cada una de las especies se hizo en distintos tiempos, debido de la velocidad de crecimiento que tiene cada una en medio de cultivo PDA, ya que el comportamiento *in vitro* de las especies de *Colletotrichum* puede variar bajo estas condiciones (Sutton 1992, Guarro *et al.* 1999, Du *et al.* 2005).

Inhibición *in vitro* de *Colletotrichum* spp., en presencia de folpet. Los resultados obtenidos en el experimento de sensibilidad muestran diferencias significativas (<0.0001). (Cuadro 4A) con respecto al comportamiento de las 20 cepas ante la ED₅₀ del fungicida folpet.

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas 37-TN, 7-LR, 38-TR y 13-PR presentaron una mayor inhibición, de entre el 15.78 y 26.31 %; mientras que las cepas 28-TN, 31-TN, 47-TG, 45-TG, 33-TN, 3-AR, 44-TG y 40-TG tuvieron una inhibición entre 8.49 y 13.23 %; en estos dos grupos, las cepas citadas han sido identificadas como *C. gloeosporioides*, mientras

que en un tercer grupo, las cepas 10-TC, 29-TN, 22-TC, 25-TN, 48-AR , 27-TC, 57-TI y 35-TN exhibieron un porcentaje de inhibición entre 0.00 y 7.14; destacando, dentro de todas ellas, las cepas 10-TC, 25-TN y 57-TI identificadas como *C. acutatum*. Con estos resultados se observa que *C. gloeosporioides* muestra una mayor sensibilidad a folpet que *C. acutatum*, aunque en otros estudios se cita que requiere de altas dosis (mayores a 4 g L⁻¹) para poder ser inhibido, así como de la combinación con otros fungicidas como lo es con prochloraz, sin descartar la posibilidad de que podría tener efectos de antagonismo (Freeman *et al.* 1997). Otros trabajos señalan que el folpet es un fungicida que logra inhibir con eficacia el crecimiento de *Colletotrichum* spp., *in vitro* (Rodríguez 2002, Cavallo *et al.* 2005).

Sin importar el grupo patogénico al cual pertenecen cada una de las cepas y la sensibilidad que presentan, los resultados frente a folpet señalan que *C. gloeosporioides* es mucho más sensible que *C. acutatum*, con una inhibición de crecimiento micelial *in vitro* de hasta un 26.31 %. En cuanto a *C. acutatum* se refiere, su porcentaje de inhibición osciló entre 0.00 y 7.14 %. Respecto de los grupos patogénicos, estos tuvieron el siguiente comportamiento: el grupo cuatro tuvo un promedio de inhibición del 12.25 %, siendo él más sensible de los cuatro grupos; seguido del grupo tres con un promedio de 13.71 %; mientras que en tercer lugar se ubicó el grupo dos con un porcentaje de 8.66 %; y por último, el grupo uno con un promedio de inhibición del 5.82 %. Contrario a lo posiblemente esperado, los resultados de la sensibilidad de los grupos patogénicos indican que los grupos más patogénicos también fueron los más sensibles, lo podría señalar la inexistencia de relación alguna entre el grado patogénico y la sensibilidad de cada una de las veinte cepas ante folpet. Concerniente a los resultados por cepa, estos coinciden en general con los de los demás fungicidas evaluados en el presente trabajo, que señalan a *C. gloeosporioides* como una especie más sensible, a diferencia de *C. acutatum* (Figura 10) la cual mostró una menor sensibilidad a dicho fungicida.

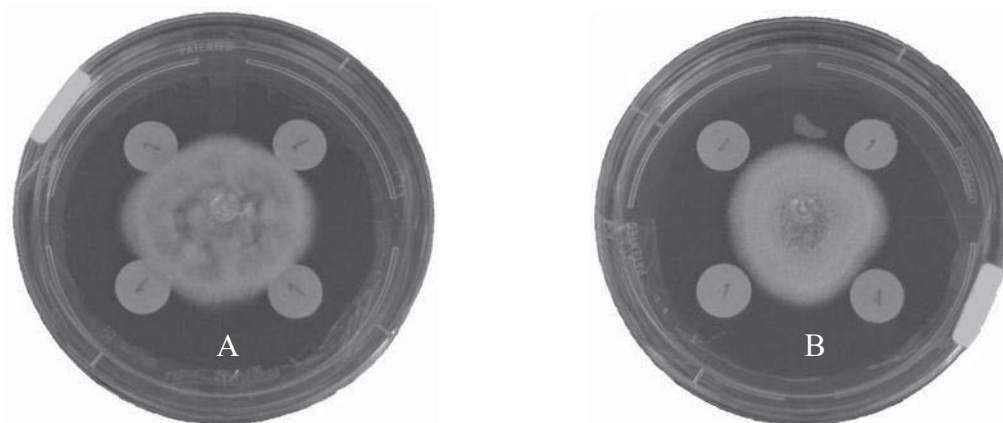


Figura 10. Inhibición del crecimiento de la colonia de *C.gloeosporioides* (A) y *C. acutatum* (B) ante la ED₅₀ de folpet.

Medio de cultivo empleado en la cosecha de micelio de *Colletotrichum* spp. Ambos medios de cultivo de PDA empleados (38 g L^{-1} + papel encerado estéril; y 43 g L^{-1}) fueron útiles para la cosecha de micelio, sin embargo, se optó por usar el medio de cultivo con la concentración más elevada (43 g L^{-1}), con la finalidad de manipular lo menos posible las cajas petri y reducir las probabilidades de contaminación con otros hongos.

Obtención del ADN. Se logró obtener ADN de cada una de las 20 cepas, lo cual se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio ($0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$), donde se confirmó la integridad y pureza del ADN extraído de las cepas en estudio. Estos resultados de extracción se obtuvieron básicamente por una doble extracción con la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50: 49: 1 v/v), además de la eliminación de un lavado más con isopropanol y los dos lavados con etanol al 70 %, con lo que se evitó la pérdida de ADN al momento de eliminar los excesos de etanol.

Análisis molecular. Los resultados obtenidos con los distintos iniciadores indicaron que al hacer la amplificación de la región ITS1 del ADN de las 20 cepas en estudio con el iniciador para el género *Colletotrichum*; se obtuvieron productos de PCR de entre 130 y 157 pb de todas las cepas (Figura 11). Este fragmento amplificado coincide con lo reportado por Cano *et al.* (2004), lo cual indica que todas las cepas analizadas corresponden al género *Colletotrichum*.

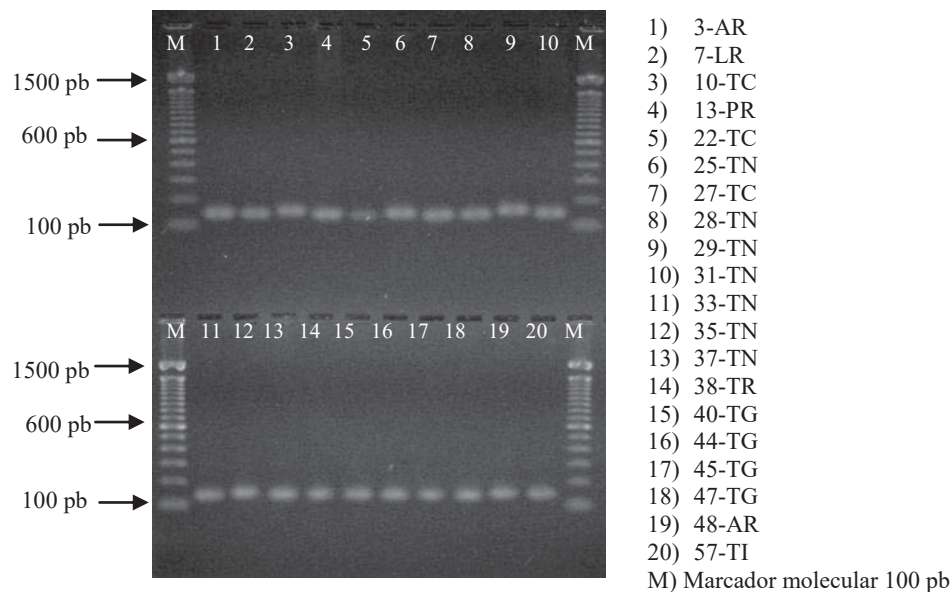


Figura 11. Patrón de bandas detectado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Col-F/Col-R específicos para *Colletotrichum* spp.

Nuevamente el ADN aislado de las cepas de *Colletotrichum* fue empleado para la reacción de PCR correspondiente con la combinación de los iniciadores CgInt/ITS4, diseñados para amplificar un fragmento de la región del ITS4 de ADNr de aproximadamente 500 pb (Figura 12), el cual es característico de la especie *C. gloeosporioides* (Adaskaveg y Hartin 1997, Föster y Adaskaveg 1999, Freeman *et al.* 2000, Ureña *et al.* 2001, Talhinhos *et al.* 2002, Álvarez *et al.* 2005, Rivera 2006, Whitelaw *et al.* 2007). Los productos de amplificación obtenidos fueron los esperados para las cepas 3-AR, 7-LR, 25-TN, 27-TC, 28-TN, 31-TN, 33-TN, 37-TN, 38-TR y 40-TG. Por otra parte, los resultados obtenidos usando la combinación de oligonucleótidos iniciadores CaInt2/ITS4 diseñados para *C. acutatum*, generaron un fragmento de aproximadamente 500 pb en las cepas 10-TC, 25-TC, 35-TC y 57-TI identificadas como *C. acutatum* en base al estudio morfológico. Estos resultados coinciden con los reportados por Adaskaveg y Hartin (1997), Freeman *et al.* (1998, 2000, 2001), Talhinhos *et al.* (2002), Peres *et al.* (2002), Afanador *et al.* (2003), Álvarez *et al.* (2005) y Rivera (2006), quienes obtuvieron un amplicón de aproximadamente 490 pb (Figura 12). Sin embargo las cepas 3-AR, 25-TN, 35-TN y 20-TI, presentaron un amplicón de aproximadamente 500 pb con ambos oligonucleótidos específicos, lo que podría estar indicando la posibilidad de contaminación de las muestras durante el proceso de multiplicación del patógeno. Por otra parte, las cepas 13-PR, 22-TC, 44-TG, 45-TG, 47-TG y 48-AR; no mostraron productos de amplificación con

ninguno de los iniciadores específicos, lo que sugiere la probable existencia de otra especie involucrada con la antracnosis en frutos de aguacate, que debido a sus características morfológicas y de sensibilidad *in vitro*, pueda estar siendo confundida con las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*.

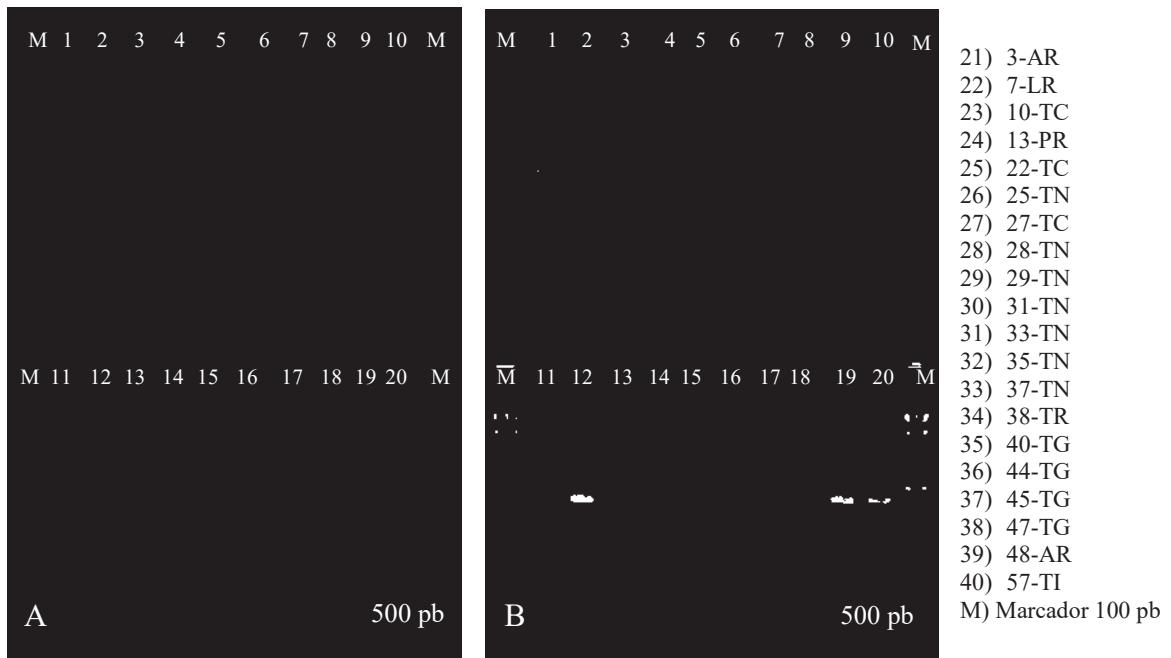


Figura 12. Patrón de bandas obtenido mediante PCR de muestras de ADN de 20 cepas de *Colletotrichum* spp., amplificado con la combinación de los oligonucleótidos CgInt/ITS4 (A) y CaInt2/ITS4 (B), específicos para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, respectivamente.

CONCLUSIONES

Con base en las condiciones experimentales y en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se concluye lo siguiente:

El estudio morfológico indicó la presencia de dos especies de *Colletotrichum* causando daño en frutos de aguacate colectados en la franja aguacatera de Michoacán, predominando la especie *gloeosporioides*.

En el estudio de sensibilidad fúngica *in vitro*, a excepción de benomilo, ninguno de los tres fungicidas probados fue útil en la diferenciación de las dos especies de *Colletotrichum* identificadas en el análisis morfológico.

C. gloeosporioides presentó mayor inhibición de su crecimiento *in vitro* en presencia de los fungicidas folpet, oxiclورو de cobre y mancozeb, respecto del crecimiento exhibido por *C. acutatum*.

El fungicida folpet causó la mayor inhibición del crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*, mientras que el oxiclورو de cobre lo hizo con *C. acutatum*.

El estudio molecular en el nivel de ADN indicó la presencia de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* causando antracnosis en frutos de aguacate, confirmando los resultados obtenidos en el estudio morfológico y de sensibilidad *in vitro*.

LITERATURA CITADA

- Abang, M. M., Fagbola, O., Smalla, K., Winter, S. 2005. **Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., from yam (*Dioscorea* spp.).** *Journal Phytopathology*. 153:137-142.
- Abang, M. M., Green, K. R., Wanyera, N. W., Iloba, C. **Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. From yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria.** In: Akoroda, A. O., Ngeve, J.M. (eds), *Root Crops in the 21st Century. Proceedings of the 7th Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops Africa Branch, Cotonou, Bénin.* 2001. Pp. 613-615.
- Adaskaveg, J. E. and Hartin, R. J. 1997. **Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California.** *Phytopathology* 87 (9): 979-987.
- Afanador-Kafuri, L., -Minz, D., Maymon, M. and Freeman, S. 2003. **Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus.** *Phytopathology*. 93 (5): 579-587.
- Agrios, N. G. 1989. **Fitopatología.** LIMUSA. Grupo Noriega y Editores. México. 756 pp.
- Alexopoulos C.J. y Mims C.W., 1985. **Introducción a la micología.** Ed. Omega S. A. Barcelona, España.
- Álvarez, E., Ospina, C.A., Mejía, J.F. y Llano, G.A. 2005. **Caracterización morfológica patogénica y genética y del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en Guanábana (*Annona muricata*) en el Valle del Cauca.** *Fitopatología Colombiana* 28(1): 1-8.
- Anderson, J. M., Pegg. K. G., Willingham, S. L., Coates, L. M., Cooke, A. W. y Dean, J. R. 2003. **Influencia del patrón y de la nutrición mineral sobre el desarrollo de la antracnosis en el aguacate ‘Hass’.** En: *Memorias del V Congreso Mundial del Aguacate. Granada-Málaga, España. Resúmenes. Anexo. A- 207.* Pp. 8-9.
- Arauz, L. F. 2000. **Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management.** *Plant Disease*. 86 (6): 600-611.

- Ávila-Adáme, C., Olaya, G., and Köller, W. 2003. **Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to Strobirulin-related Qol fungicide**, Plant Dis. 87: 1426-1432.
- Ávila-Quezada, G. D. 2007. **Enfermedades más importantes en México y en el mundo**. En Téliz-Ortiz, D. y Mora, A. 2007. **El aguacate y su manejo integrado**. 2ª Edición. Mundi-Prensa. México, D.F. 321 p.
- Bailey, A. J. y Jeger, J. M. 1992. ***Colletotrichum: Biology, pathology and control***. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. 388 pp.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Fourth edition. APS PRESS. St. Paul Minnesota.
- Bernstein, B., Zehr, E. I., Dean, R. A. and Shabi, E. 1995. **Characteristic of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and other hosts**. Plant Disease. 79: 478-482.
- Binyamini, N., and Schiffman-Nadel, N. 1972. **Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides***. Phytopathology. 62: 592-594
- Bonde, M. R., Peterson, G. L., and Maas, J. L. 1991. **Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry**. Phytopathology. 81: 1523-1528.
- Brown, A. E., Sreenivasaprasad, S., and Timmer, L. W. 1996. **Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum***. Phytopathology. 86: 523-527.
- Cannon, P. F., Bridge, P. D. and Monte, E. 2000. **Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics**. In: Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M. B. 2000. ***Colletotrichum* host specificity, pathology and host-pathogen interaction**. The American Phytopathological Society. St. Paul MN. pp. 1-20.
- Cano, J., Guarro, J. and Gene, J. 2004. **Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest**. Journal of Clinical Microbiology 42 (6): 2450-2454.
- Cavallo, A. R., Novo, R. J. y Pérez, M. A. 2005. **Eficiencia de los fungicidas en el control de la flora fúngica transportada por semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.) en la Argentina**. Agriscientia. XXII: (1): 9-16.

- Coates, L. M., Stirling, A. M., Cooke, A. W. and Cannon, K. T. 1995. **Biological control of avocado anthracnose**. In: McCarthy, A. Ed. **Proceedings of the Australian Avocado Growers' Federation Conference "The Way Ahead"**. Department of Agriculture, Western Australia. Pp. 115-119.
- Denoyes, B. and Braudry, A. 1995. **Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics**. *Phytopathology*. 85:53-57.
- Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1995. **Basic plant pathology method**. Second edition. CRC Lewis Publishers. Pp 267-286.
- Dodd, J. C., Estrada, A. and Jeger, M. J. 1992. **Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics**. In Bailey, A. J. and Jeger, J. M. 1992. ***Colletotrichum: Biology, pathology and control***. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. Pp. 308-325.
- Du, M., Schardl, C. L., Nuckles, E. M. and Vaillancourt, L. J. 2005. **Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes**. *Mycologia*. Mycological Society of America. 97 (3): 641-658.
- Everett, K. R. and Pak, H. A. 2002. **Infection criteria for pathogens causing body rots in avocado**. NZ Avocado Growers Association Annual Research Report Vol.2.
- Everett, K. R. y Timudo-Torrevilla, O. E. 2007. ***In vitro* fungicide testing for control of avocados fruit rots**. *New Zealand Plant Protection*. 60: 99-103.
- Everett, K. R., Owen, S. G., and Cutting, J. G. M. 2005. **Testing efficacy of fungicides against postharvest pathogens of avocado (*Persea americana* cv. Hass)**. *New Zealand Plant Protection*. 58: 89-95.
- FAOSTAT, 2007. En: <http://www.fao.org/es/ess/top/country.html?lang=es&country=138&year=2007>
- Fitzell, R. D. 1987. **Epidemiology of anthracnose disease of avocados**. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*. 10: 113-116.

- Förster, H., and Adaskaveg, J. E. 1999. **Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California.** Phytopathology. 89: 1056-1065 pp.
- Freeman, S. 2000. **Genetic, diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits.** In Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M. B. ***Colletotrichum* host specificity, pathology and host-pathogen interaction.** The American Phytopathological Society. St. Paul MN. Pp. 131-144.
- Freeman, S. and Katan, T. 1997. **Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of Strawberry in Israel.** Phytopathology. The American Phytopathological Society. 87 (5): 516-521.
- Freeman, S., Horowitz, S., and Sharon, A. 2001. **Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants.** Phytopathology. 91: 986-992.
- Freeman, S., Katan, T. and Shabi, E. 1998. **Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits.** Plant Disease. The American Phytopathological Society. 82 (6): 596-605.
- Freeman, S., Katan, T., and Shabi, E. 1996. **Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity test.** Appl. Environ. Microbiol. 62: 1014-1020.
- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., and Shabi, E. 2000. **Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits.** Phytopathology. 90: 608-614.
- Freeman, S., Nizani, Y., Dotan, S., Even, S., and Sando, T. 1997. **Control of *Colletotrichum acutatum* in strawberry under laboratory, greenhouse, and field conditions.** Plant Disease. 81: 749-752.
- Freeman, S., Shalev, Z. and Katan, J. 2002. **Survival in soil of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* pathogenic on strawberry.** Plant Disease. 86 (9): 965-970.
- Gallegos, E. R. 1983. **Aspectos del aguacate y su producción en Michoacán.** Ed. Patronato Universitario, UACH. Chapingo, Edo. de México, México. 317 p.

- Guarro, J., Gene J. and Stchigel, A. M., 1999. **Developments in fungal taxonomy**. Clinical Microbiology Reviews. 12 (3): 454-500.
- Guillén-Andrade, H., Lara-Chávez, B. N., Gutiérrez-Contreras M., Ortiz-Catón, M. y Ángel-Palomares, E. 2007. **Cartografía agroecológica del aguacate en Michoacán**. Morevallado editores de Morelia, Michoacán, México. 141 p.
- Gunnell, S. P. and Gubler, D. W. 1992. **Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to Strawberry**. Micología. 84 (2): 157-165.
- Gutiérrez, A. O., Nieto, A. D., Gutiérrez, A. J. G., Delgadillo, S. F. y Domínguez, A.J. L. 2002. **Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp., obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajaba* L.)**. Revista Mexicana de Fitopatología. 20 (1): 24-30.
- Gutiérrez-Chapin, L. J., Wang, Y., Lutton, E., and McSpadden Gardener, B. B. 2006. **Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesions on tomatoes grown in Ohio**. Plant Disease. 90: 397-403.
- Gutiérrez-Contreras, M. 2008. **Diagnóstico genético y patogénico de *Colletotrichum* spp., en el área aguacatera de Michoacán, México**. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nayarit. Xalisco, Nayarit, México. 86 p.
- Hartill, W. F. T. 1991. **Post-harvest disease of avocado fruits in New Zealand**. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 19 p.
- Hartill, W. F. T. 1992. **Post-harvest rots of avocado in New Zealand and their control**. In: Brighton Crop Prot. Conf., Brighton, UK. 1157-1162.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 2004. **El reino de los hongos. Micología básica y aplicada**. 1ra. Reimpresión. UNAM. Fondo de Cultura Económica. México D. F. 551 p.
- Howard, C. M., Maas, J. L., Chandler, C. K., and Albregts, E. E. 1992. **Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida**. Plant Disease. 76: 976-981.
- Kim, G. W., Moon, G. Y., Cho, W. and Park, D. S. 1999. **Anthracnose of safflower caused by *Colletotrichum acutatum***. Plant Pathology Journal. 15 (1): 62-67.

- Lewis, I. M. L., Nava-Díaz, C. and Miller, S. A. 2004. **Identification and management of *Colletotrichum acutatum* of immature bell peppers.** Plant Disease. 88 (11): 1198-1204.
- Martín, M. P. and García-Figueroles, F. 1999. ***Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* cause anthracnose on olives.** European Journal Plant Pathology. 105: 735-741.
- Martínez, C. M. y Zambrano, C. 1994. **Variantes morfológicas de cepas del género *Colletotrichum* asociadas al cultivo del café *Coffea arabica*, L. en diferentes pisos altitudinales de la región centro occidental de Venezuela.** Agronomía tropical. 44 (4): 679-692.
- Martínez, B. R. 1974. **Relación de enfermedades del aguacatero en la región de Uruapan, Michoacán.** En Memorias del II Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. Mazatlán, Sinaloa. México.
- Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., and Freeman, S. 2006. **Identification and characterization of benomyl-resistant and sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.).** Phytopathology. 96: 542-548.
- Mills, P. R., Hodson, A. y Brown, A. E. 1992. **Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical.** In: Bailey, A. J. y Jeger, J.M. 1992. ***Colletotrichum: Biology, pathology and control.*** British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. 269-288 Pp.
- Morales, G. J. L. 1996. **Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* en Michoacán.** Tesis de maestría. C. P. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 58 p.
- Morales, G. J. L. y Vidales, F. J. A., 1994. **Enfermedades del aguacate en Michoacán.** Folleto para productores N° 24. SARH – INIFAP – CIPAC – Uruapan, Michoacán, México. 19 p.
- Munsell[®], 1975. **Soil color charts.** Macbeth Division of Kollmorgen corporation 2441 North Calvert Street Baltimore, Maryland 21218.
- O'Connell, R., Perfect, S., Hughes, B., Carzaniga, R., Bailey, J., and Green, J. 2000. **Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes.** In: ***Colletotrichum***

host specificity, pathology and host-pathogen interaction. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 57-77.

- Orozco-Santos, M., Manzo- Sánchez, G., Guzmán-González, S. Fariás- Larios J. y Timmer, L. W. 2004. **Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos.** Revista Mexicana de Fitopatología. 22 (3): 423-428.
- Pegg, K. G., Coates, L. M., Korsten, L. y Harding, R. M. 2007. **Enfermedades foliares del fruto y el suelo.** En: Whiley, A. W., Schaffer B. and Wolstenholme, B. N. 2007. **El palto. Botánica, producción y usos.** Ediciones Universitarias de Valparaíso. 25-45 Pp.
- Peres, N. A. R., Kim, S., Beck, H. W., Souza, N. L., and Timmer, L. W. 2002. **A fungicide application decision (FAD) support system postbloom fruit drop of citrus (PFD).** Online. Plant Health Progress DOI:10.1094/PHP-2002-0731-01-RV.
- Peres, N. A. R., Souza, N. L., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2004. **Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus.** Plant Disease. 88: 125-130.
- Peres, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E. and Correll, J. C. 2005. **Life styles of *Colletotrichum acutatum*.** Plant Disease. 89 (8): 784-796.
- Peres, R. A. N., Kuramae, E. E., Dias, C. S. M and De Souza L. N. 2001. **Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil.** Phytopathology. 150: 128-134.
- Prior, C., Elango, F., and Whitewell, A. 1992. **Chemical control of *Colletotrichum* infection in mangoes.** In: ***Colletotrichum: Biology, pathology and control.*** J. A. Bailey and M. J. Jeger, eds. CAB Int., Wallingford, UK. 326-336 Pp.
- Prusky, D. 1996. **Pathogen quiescence in postharvest diseases.** Annu. Rev. Phytopathol. 34: 413-434.
- Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M. 2000. ***Colletotrichum* host specificity, pathology and host-pathogen interaction.** APS PRESS. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.

- Prusky, D., Keen, N. T. and Eaks, I. 1983. **Further evidence for the involvement of a preformed antifungal compound in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits.** Physiological. Plant Pathology. 22: 189-198.
- Prusky, D., Kobiler, I., Plumbley, R., Keen, N. T. and Sims, J. J. 1992. **Regulation of natural resistance of avocado fruit for the control of postharvest disease.** Second World Avocado Congress. pp. 479- 484.
- Rivera-Vargas, L. I., Lugo-Noel, Y., McGovern, R. J. Seijo, T. and Davis, M. J. 2006. **Occurrence and distribution of *Colletotrichum* spp., on mango (*Mangifera indica* L.) in Puerto and Florida, USA.** Plant Pathology Journal. 5 (2): 191-198.
- Rodríguez de, O. M. 2002. **Etiología y control químico de la aceituna jabonosa causada por *Colletotrichum* spp.** Universidad de Córdoba, centro de lectura. Ingenieros agrónomos.
- Rodríguez de, O. M. 2002. **Etiología y control químico de la aceituna jabonosa causada por *Colletotrichum* spp.** Universidad de Córdoba, centro de lectura. Ingenieros agrónomos.
- Romero, C. S. 1993. **Hongos fitopatógenos.** Universidad Autónoma de Chapingo. México. 32 Pp.
- Sánchez, P. J. L., Alcántar, R. J. J., Coria, A. V. M., Anguiano, C. J., Vidales, F. I., Tapia, V. L. M., Aguilera, M. J. L. Hernández, R. G. y Vidales, F. J. A. 2001. **Tecnología para la producción de aguacate en México.** INIFAP. Libro Técnico No. 1. 208 p.
- Sánchez-Vargas, J. H. 1994. **Combate químico de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en árboles de guanábana (*Annona muricata* L.) en Batán de Matina.** Tesis de licenciatura. Universidad de Costa Rica. 51 p.
- Shabi, E., and Katan, T. 1983. **Occurrence and control of anthracnose of almond in Israel.** Plant Disease. 67: 1364-1366.
- Shi, Y., Correll, J. C., Guerber, J. C., and Rom, C. R. 1996. **Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter root of apple in the southeastern United States.** Plant Disease. 80: 692-696.

- Simmonds, J. H. 1965. **A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruits rots in Queensland.** Qld. Agric. Sci. 22: 437-459.
- Smith, B. J. and Black, L. L. 1990. **Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry.** Plant Disease. 74 (1): 69-76.
- Smith, C. E. Jr. 1966. **Additional notes on pre-conquest avocados in Mexico.** Economic Botany. 23: 135-140.
- Sutton, B. C. 1992. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*.** In Bailey, A. J. y Jeger, J.M. 1992. ***Colletotrichum: Biology, pathology and control.*** British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. 388 pp.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J. and Oliveira, H. 2005. **Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose.** Applied Environmental Microbiology. 71 (6): 2987-2998.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., and Oliveira, H. 2002. **Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins.** Phytopathology. 92: 986-996.
- Téliz, O. D. y Marroquín, P. F. J. 2007. **Importancia histórica y socioeconómica del aguacate.** En Téliz-Ortiz, D., y Mora, A. 2007. **El aguacate y su manejo integrado.** 2ª Edición. Mundi-Prensa. México, D.F. 321 Pp.
- Ureña, P. A. R., Mitchel, D. J. and Legard, D. E. 2001. **Oversummer survival of inoculums for *Colletotrichum* crown rot in buried strawberry crown tissue.** Plant Disease. 85 (7): 750-754.
- Verma, N., MacDonald, L., and Punja, Z. K. 2006. **Environmental and host requirements for field infection of blueberry fruits by *Colletotrichum acutatum* in British Columbia.** Plant Pathology. 1-7.
- Walker, J., Nikandrow, A. and Millar, G. D. 1991. **Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in the genus *Colletotrichum*.** Mycological Research. 95:1175-1193.

- Whiley, A. W., Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. 2007. **El palto. Botánica, producción y usos**. Ediciones Universitarias de Valparaiso. PP. 9-11.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: **PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications**. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White, eds. Academic Press, San Diego, CA. PP. 315-322.
- Whitelaw, W. M. A., Curtin, S. J., Huang, R., Steel, C. C., Blanchard, C. L., and Roffey, P. E. 2007. **Phylogenetic relationship and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia**. Plant Pathology. 56: 448-463.
- Willingham, S. L., Pegg, K. G., Cooke, A. W., Coates, L. M., Langdom, P.W.B. and Dean, J. R. 2001. **Rootstock influences postharvest anthracnose development in 'Hass' avocado**. Australian Journal of Agricultural Research. 52: 1017-1022.
- Wolstenholme, B. N. 2007. **Ecología: El clima y el ambiente edáfico**. En: Whiley, A. W., Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. 2007. **El palto. Botánica, producción y usos**. Ediciones Universitarias de Valparaiso. pp. 75-101.
- Zulfiqar, M., Bransky, R. H., and Timmer, L. W. 1996. **Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides***. Mycologia. 88: 121-128.

PERSPECTIVAS

Los estudios hechos para diferenciación de las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, señalan la presencia de ambas ocasionando daños en frutos de aguacate. Sin embargo, existe la posibilidad de la presencia de una nueva o nuevas especies de *Colletotrichum* que pudieran estar relacionadas con la enfermedad conocida como antracnosis y sus diversos síntomas. Por lo cual, existe la posibilidad de ampliar el presente trabajo con miras a hacer un nuevo muestreo, en el cual se pretendería coleccionar no solamente frutos de aguacate afectados por la enfermedad, si no cualquier otra parte del árbol en producción, como pueden ser ramas y flores. La identificación de las nuevas especies se llevaría a cabo mediante estudios morfológicos y moleculares, lo que ayudaría a rediseñar las estrategias de control empleadas para llegar a disminuir las pérdidas económicas que se generan a consecuencia de las especies de este género.

APÉNDICE

Cuadro 1A. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de benomilo de cepas de *Colletotrichum* spp., aisladas de aguacate.

FV	GL	SC	CM	F Cal	Prob > F
CEPA	19	28704.021	1510.74	181.8140	<.0001
Error	60	498.555	8.31		
C. Total	79	29202.576			

Cuadro 2A. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de mancozeb de cepas de *Colletotrichum* spp., aisladas de aguacate.

FV	GL	SC	CM	F Cal	Prob > F
CEPA	19	1816.1722	95.588	4.7572	<.0001
Error	60	1205.6044	20.0934		
C. Total	79	3021.7766			

Cuadro 3A. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de oxiclورو de cobre de cepas de *Colletotrichum* spp., aisladas de aguacate.

FV	GL	SC	CM	F Cal	Prob > F
CEPA	19	1693.7451	89.1445	3.1121	0.0004
Error	60	1718.6413	28.644		
C. Total	79	3412.3864			

Cuadro 4A. Análisis de varianza para porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de folpet de cepas de *Colletotrichum* spp., aisladas de aguacate.

FV	GL	SC	CM	F Cal	Prob > F
CEPA	19	3497.1134	184.059	9.2038	<.0001
Error	60	1199.8857	19.998		
C. Total	79	4696.9992			

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

Cuadro 5A. Componentes e reacción de la solución para la extracción de ADN de hongos filamentosos.

Solución base	[Final]	Cantidad (1 L)
Tris-HCl pH 8.5	200 mM	400 g
NaCl (PM = 58.44)	250 mM	500 g
EDTA Na ₂ pH 8 (PM = 372.24)	25 mM	20 g
SDS (PM = 288.40)	0.5 %	5 g

Aforar a 1 L

Cuadro 6A. Componentes de la reacción fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (50: 49: 1 v/v).

Solución base	[Final]	Cantidad (1 L)
Fenol Tris-HCl pH 8	0.1 M	500.0 mL
Cloroformo (PM = 119.38)	1 M	490.0 mL
Alcohol isoamílico (PM = 88.15)	1 M	10.0 mL

Ajustar el pH a 8 con ácido acético glacial

Cuadro 7A. Componentes de reacción para la solución de gel TAE 10 X.

Solución base	[Final]	Cantidad (1 L)
Tris base (PM = 121.10)	400 mM	48.40 g
NaOAc (PM = 82.03)	50 mM	4.10 g
Na ₄ EDTA (PM = 380.20)	7.7 mM	2.92 g

Ajustar el pH a 8 con ácido acético glacial

Cuadro 8A. Componentes de reacción para la solución de gel TBE 5X.

Solución base	[Final]	Cantidad (1 L)
Tris base (PM = 121.10)	0.45 M (Tris-borato)	54.0 g
Ácido bórico (PM = 61.83)		27.5 g
EDTA Na ₂ pH 8.0	10 mM	20.0 mL

Llevar el pH a 8 con ácido acético glacial

Cuadro 9A. Componentes de reacción para la solución SGB 5 X.

Solución base	[Final]	Cantidad (50 mL)
1 M Tris pH 8.0	50 mM	2.5 mL
0.5 M EDTA pH 8.0	5 mM	0.5 mL
Sacarosa 50 %	25 %	12.5 g
BPB	2 mg mL ⁻¹	100.0 mg
XC (optativo)	2 mg mL ⁻¹	100.0 mg
ddH ₂ O		afore a 50.0 mL

BPB = azul de bromofenol, sal disódica
 XC = cianol de xileno