



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales
Programa Institucional de Maestría en Ciencias
Biológicas

INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES

**“Caracterización genética de especies de *Colletotrichum*
causantes de la antracnosis de mango en el estado de
Jalisco, México”.**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Maestra en Ciencias Biológicas
Área: Interacción Planta-Microorganismo-Insecto

PRESENTA

Biól. Daniela Pineda Vaca

Asesor: Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado

Comité Tutorial

Dra. Sylvia P. Fernández Pavía (Co-asesora). IIAF-UMSNH
Dr. Juan Carlos Montero Castro. Facultad de Biología-UMSNH
Dr. Ricardo Santillán Mendoza. Campo Experimental Ixtacuaco-INIFAP
Dra. Edith Garay Serrano. Instituto de Ecología-INECOL

Morelia, Michoacán. Julio de 2022

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado y la coasesoría de la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía.

Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) becario No. 758883 y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

DEDICATORIA

A mi mamá por apoyarme e impulsarme a ser una mejor persona. Te agradezco el amor, la paciencia, la confianza y el tiempo que me has otorgado. Te amo infinitamente.

A mi papá por inspirarme a dar lo mejor de mí y vivir la vida al máximo. Gracias por estar presente cuando te necesito, por el amor y la sabiduría que me brindas. Te amo con todo mi ser.

A mis hermanos Diana y Luis por todos los momentos inolvidables que hemos pasado juntos y llenarme de alegría día tras día. Los amo a los dos, sin importar la estatura que tengan.

A mi abuelita pepa y a mi abuelita nena quienes son una parte esencial de mi formación, educación y de mis valores como persona. Gracias por su amor, esfuerzo, dedicación e inmensa paciencia. Las quiero mucho.

A mi tía Paty por estar presente en todos los momentos de mi vida, ofreciéndome lo mejor para mí persona y encaminándome por el buen sendero. Eres una persona admirable y te quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado por darme la oportunidad de crecer profesionalmente, por la confianza depositada en mi persona, por los consejos e ideas ofrecidas para la realización de este trabajo. Además, el apoyo y la paciencia que me ha otorgado estos años.

A la Dra. Sylvia P. Fernández Pavía por su ayuda, sus valiosos consejos y sus comentarios a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A mi comité tutorial, el Dr. Juan Carlos Montero Castro, el Dr. Ricardo Santillán Mendoza y la Dra. Edith Garay Serrano por las correcciones, sugerencias y el tiempo que dedicaron durante los tutorales y la revisión del presente trabajo.

Al Ing. Rubén Ortega Arreola por su invitación para ir a visitar las huertas afectadas, por el apoyo en la comunicación con los productores de cada huerta, así como, su asistencia técnica durante la colecta de las muestras.

A toda mi familia por sus oraciones, consejos y palabras de aliento y porque siempre me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mis amigos y compañeros del laboratorio por el apoyo brindado, la convivencia y las experiencias compartidas, que hacen más agradable el entorno de trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales por ofrecer el espacio y el financiamiento para el desarrollo del proyecto. Así como, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de maestría (Becaria 758883).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Aspectos botánicos y producción del mango.	4
2.2 Enfermedades del mango.	4
2.3. Enfermedad de antracnosis en mango.	5
2.4. Síntomas de antracnosis causados por <i>Colletotrichum</i> .	6
2.5. Especies de <i>Colletotrichum</i> que causan antracnosis.	6
2.6. Aspectos del género <i>Colletotrichum</i> .	7
2.7. Caracterización genética de las especies de <i>Colletotrichum</i> .	7
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	9
5. OBJETIVOS	9
5.1. Objetivo General.	9
5.2. Objetivos Específicos.	9
6. MATERIALES Y MÉTODOS	10
6.1. Colecta de frutos enfermos.	10
6.2. Aislamiento de hongos.	11
6.3. Obtención de ADN genómico.	12
6.4. Amplificación por PCR de secuencias parciales.	12
6.5. Análisis BLAST.	13
6.6. Análisis filogenéticos.	13
6.7. Pruebas de patogenicidad.	17
6.7.1. Ensayo preliminar.	17
6.7.2. Pruebas en frutos y hojas de mango Keitt.	18
6.7.2.1. Colecta de frutos y hojas.	18
6.7.2.2. Preparación del inóculo.	18
6.7.2.2. Inoculación de frutos.	18
6.7.2.4. Inoculación de hojas.	19

6.7.3 Pruebas en hojas de mango Keitt.	19
6.8. Análisis de secuencias repetidas simples internas (ISSR).	19
6.9. Análisis de datos de los ISSRs y diversidad genética.	20
7. RESULTADOS	22
7.1. Síntomas de antracnosis en campo.	22
7.2. Aislamiento de hongos.	22
7.3. Identificación del género de los aislados con análisis BLAST.	22
7.4. Análisis filogenético de los aislados de <i>Colletotrichum</i> .	26
7.5. Pruebas de patogenicidad.	28
7.5.1. Ensayo preliminar.	28
7.5.2. Pruebas en frutos y hojas de mango Keitt.	28
7.5.3. Pruebas en hojas de mango Keitt.	31
7.6. Análisis de secuencias repetidas simples internas.	31
7.7. Análisis de datos de los ISSRs y diversidad genética.	34
8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	41
10. REFERENCIAS	42
11. ANEXOS	49
11.1. Análisis filogenéticos.	49
11.1.1. Crear archivos de secuencias.	49
11.1.2. Alineamiento.	51
11.1.3. Concatenar secuencias.	57
11.1.5. Determinar modelo evolutivo.	59
11.1.6. Análisis de Máxima Verosimilitud.	61
11.1.7. Inferencias Bayesianas.	64
11.1.8. Árbol filogenético.	70
11.2. Análisis en GenAlex.	76
11.2.2. Matriz Binaria.	76
11.2.2. Matriz GenAlex.	76
11.2.3. Análisis exploratorios.	77
11.2.4. Análisis molecular de varianza (AMOVA).	80

11.2.5. Prueba de Mantel.	82
11.3. Análisis en PoppR.	84
11.3.1. Matriz.	84
11.3.2. Script.	85
11.3.3. Consola.	86
11.4. Análisis en Structure	92
11.4.1. Matriz.	92
11.4.2. Cargar documento.	93
11.4.3. Parámetros para el análisis.	94
11.4.4. Análisis de la estructura genética.	95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características de los oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones nuclear y ribosomal analizadas en este estudio.	13
Cuadro 2. Aislados de <i>Colletotrichum</i> que se utilizaron en el análisis filogenético y números de accesoión del GenBank de siete regiones y genes nucleares y ribosomales.	15
Cuadro 3. Tratamientos utilizados en el ensayo preliminar de las pruebas de patogenicidad.	17
Cuadro 4. Aislados recuperados de mangos de la variedad Kent con antracnosis en tres municipios del estado de Jalisco.	23
Cuadro 5. Aislados cuyas secuencias parciales de la región ITS y el gen <i>gpdh</i> son idénticas entre sí.	26
Cuadro 6. Pruebas de patogenicidad en hojas y frutos de mango (n° síntomas/n° inoculaciones) con y sin herida, de 9 aislados de <i>Colletotrichum siamense</i> , y 1 aislado de <i>C. asianum</i> seleccionados al azar.	30
Cuadro 7. Análisis de diversidad genética de aislados de <i>Colletotrichum siamense</i> obtenidos de frutos de mango con síntomas de antracnosis, en cuatro huertas de dos municipios del estado de Jalisco.	34
Cuadro 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para poblaciones de <i>Colletotrichum siamense</i> recuperadas de frutos de mango con síntomas de antracnosis, en cuatro huertas de dos municipios del estado de Jalisco.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de los sitios donde se colectaron los frutos de mango con antracnosis.	10
Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con ocho regiones y genes de 75 aislados de <i>Colletotrichum</i> .	27
Figura 3. Resultados de las pruebas de patogenicidad en frutos y hojas de mango variedad Keitt siete días después de la inoculación.	29
Figura 4. Diferentes síntomas encontrados en las hojas y frutos de mango inoculadas con <i>Colletotrichum</i> .	31
Figura 5. Comparación de dos repeticiones con cinco oligonucleótidos ISSR, utilizando ocho de las 10 cepas probadas.	32
Figura 6. Diferentes patrones de bandeo detectados entre los aislados de <i>C. siamense</i> para cada uno de los cinco oligonucleótidos ISSR.	33
Figura 7. Red de mínima extensión para 59 MLGs obtenidos de 62 aislados de <i>C. siamense</i> .	36
Figura 8. Proporciones de los dos grupos genéticos más probables obtenidos con el análisis bayesiano de agrupamiento no jerárquico para cada huerta muestreada, colocados en su posición geográfica aproximada.	37
Figura 9. Directorio de trabajo donde se guardan los archivos de las secuencias descargadas del GenBank utilizando R.	50
Figura 10. Archivos de secuencias de dos genes.	51
Figura 11. Ejemplo de la página del EMBL-EBI para realizar el alineamiento utilizando MUSCLE.	52
Figura 12. Pasos para descargar el alineamiento y guardar como archivo FASTA.	53
Figura 13. Página del NCBI con la secuencia de ITS de la especie <i>C. boninense</i> , la cual tiene los nucleótidos que abarca cada gen.	54
Figura 14. Ubicación de la región ITS1 en la secuencia de <i>C. boninense</i> y posteriormente en el alineamiento.	55

Figura 15. Pasos para editar el alineamiento y obtener las secuencias de la región ITS1.	56
Figura 16. Pasos para guardar el alineamiento nuevo de un solo gen.	57
Figura 17. Pasos para cargar alineamientos en Sequence Matrix.	58
Figura 18. Pasos para exportar las matrices concatenadas.	59
Figura 19. Pasos para cargar un alineamiento en el programa jModelTest.	59
Figura 20. Pasos para iniciar el análisis de los puntajes de probabilidad para cada modelo evolutivo.	60
Figura 21. Pasos para los criterios de AIC y BIC para seleccionar un modelo evolutivo adecuado.	61
Figura 22. Pasos para cargar matriz concatenada en raxmlGUI.	62
Figura 23. Pasos para agregar las particiones (genes) en la matriz de raxmlGUI.	62
Figura 24. Parámetros para realizar el análisis de máxima verosimilitud en raxmlGUI.	63
Figura 25. Resultados del análisis filogenético.	64
Figura 26. Modificar archivo nexus para ser leído por MrBayes.	65
Figura 27. Iniciar análisis de las inferencias bayesianas utilizando un archivo ejecutable de MrBayes.	66
Figura 28. Crear un nuevo folder y cargar archivo de MrBayes en la página de CIPRES.	67
Figura 29. Pasos para crear una nueva tarea en la página de CIPRES.	68
Figura 30. Visualizar árbol obtenido de MrBayes con FigTree.	69
Figura 31. Pasos para visualizar el árbol filogenético de máxima verosimilitud en FigTree.	70
Figura 32. Pasos para modificar la visualización del árbol filogenético de máxima verosimilitud.	71
Figura 33. Pasos para guardar el árbol filogenético como imagen en FigTree.	72
Figura 34. Modificar las dimensiones de las diapositivas en PowerPoint	73

Figura 35. Pasos para reemplazar ramas del árbol filogenético.	73
Figura 36. Pasos para reemplazar las etiquetas del árbol filogenético.	74
Figura 37. Pasos para guardar el árbol como imagen.	75
Figura 38. Modificar figura final.	75
Figura 39. Ejemplo de matriz binaria de aislados de <i>C. siamense</i> recuperados de lesiones de antracnosis en mango, utilizando cinco oligonucleótidos ISSR.	76
Figura 40. Ejemplo de la matriz para hacer los análisis en GenAlex.	77
Figura 41. Pestaña de GenAlex en Excel.	77
Figura 42. Pasos a seguir para comenzar los análisis exploratorios en GenAlex.	78
Figura 43. Pestaña BAFP de los resultados del análisis de frecuencias.	79
Figura 44. Pestaña uNeiP de los resultados del análisis de frecuencias. Matices con la distancia y la identidad genética de Nei.	79
Figura 45. Pasos a seguir para realizar el análisis molecular de varianza (AMOVA) en GenAlex.	80
Figura 46. Pestaña PhiPT del AMOVA.	81
Figura 47. Pestaña PhiPTP del AMOVA. Muestra una matriz con las distancias genéticas entre las poblaciones.	81
Figura 48. Pestaña con las coordenadas geográficas de las poblaciones.	82
Figura 49. Pasos a seguir para la matriz de distancias en kilómetros.	83
Figura 50. Pasos a seguir para la prueba de Mantel.	83
Figura 51. Resultados de la prueba de Mantel.	84
Figura 52. Ejemplo de la matriz para hacer los análisis en PoppR.	84
Figura 53. Ilustración de R y RStudio.	86
Figura 54. Ejemplo de la matriz para hacer los análisis en Structure y como se ve en formato txt.	93
Figura 55. Pasos a seguir para cargar el archivo de la matriz en Structure.	94
Figura 56. Pasos a seguir para establecer los parámetros que se utilizaran en el análisis.	94

Figura 57. Pasos a seguir para realizar el análisis de la estructura genética de la población.	95
Figura 58. Seguimiento de la carpeta de resultados creada por Structure en el directorio de trabajo y pasos para comprimir a un archivo zip.	96
Figura 59. Análisis en la página de Structure Harvester y resultados con el cuadro con los valores para determinar el número de grupos genéticos más probable, remarcado en amarillo.	97
Figura 60. Resultados del análisis en la página de Structure Harvester del cuadro con los valores Ln de todas las corridas realizadas.	97
Figura 61. Opciones para graficar los resultados de la estructura de la población.	98

RESUMEN

La antracnosis causada por especies del género *Colletotrichum* es una de las enfermedades más importantes del mango a nivel mundial. Recientemente, en varios municipios del estado de Jalisco, se detectaron huertas comerciales con 100% de incidencia de antracnosis en la etapa de precosecha. El objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente aislados de *Colletotrichum* obtenidos de las huertas afectadas y determinar la diversidad genética de las especies involucradas. Se obtuvieron 51 frutos de mango directamente de árboles con diferentes grados de severidad de antracnosis, en cinco huertas comerciales de tres municipios de Jalisco. Se recuperó un total de 64 aislados de *Colletotrichum* de los cuales 62 pertenecen a la especie *C. siamense* y dos a *C. asianum*. Se evaluó la diversidad genética intraespecífica por medio de análisis ISSR con cinco oligonucleótidos. Una selección de 14 aislados de *Colletotrichum* fueron inoculados en hojas y frutos de mango en donde reprodujeron los síntomas de antracnosis. El resto de los aislados de *Colletotrichum* fueron inoculados en hojas de mango, reproduciendo los síntomas de antracnosis. El análisis ISSR realizado con los aislados de *C. siamense* mostró que cinco oligonucleótidos produjeron un total de 93 bandas de ADN, detectándose 59 genotipos multilocus, de los cuales el 58.87% fueron polimórficos, con una heterocigosidad esperada de 0.319. Los resultados indican la prevalencia de reproducción clonal y la variación dentro de las poblaciones muestreadas representó el 66.5% de la variación genética total. Además, la variación se puede congregarse en dos grupos genéticos. En conclusión, se determinó que dos especies del género *Colletotrichum* son los agentes causales de la antracnosis en el estado de Jalisco. Además, los análisis ISSR indicaron una alta diversidad genética relativa dentro de las poblaciones en términos del porcentaje de polimorfismos, heterocigosidad esperada y los índices de variación.

Palabras clave: *C. siamense*, análisis filogenético multilocus, ISSR, diversidad genética, pruebas de patogenicidad.

ABSTRACT

Anthrachnose caused by species of the genus *Colletotrichum* is one of the most important mango diseases worldwide. Recently, in several municipalities of the state of Jalisco, commercial orchards with 100% incidence of anthracnose in the pre-harvest stage were detected. The objective of this work was to genetically characterize *Colletotrichum* isolates obtained from the affected orchards and determine the genetic diversity of the species involved. 51 mango fruits were obtained directly from trees with different degrees of anthracnose severity, in five commercial orchards in three municipalities of Jalisco. A total of 64 isolates of *Colletotrichum* were recovered, of which 62 belong to the species *C. siamense* and two to *C. asianum*. Intraspecific genetic diversity was assessed by ISSR analysis with five oligonucleotides. A selection of 14 *Colletotrichum* isolates were inoculated on mango leaves and fruits, where they reproduced anthracnose symptoms. The rest of the *Colletotrichum* isolates were inoculated on mango leaves, reproducing the symptoms of anthracnose. The ISSR analysis performed with the *C. siamense* isolates showed that five oligonucleotides produced a total of 93 DNA bands, detecting 59 multilocus genotypes, of which 58.87% were polymorphic, with an expected heterozygosity of 0.319. The results indicate the prevalence of clonal reproduction and the variation within the sampled populations represented 66.5% of the total genetic variation. In addition, the variation can be congregated in two genetic groups. In conclusion, it was determined that two species of the genus *Colletotrichum* are the causal agents of anthracnose in the state of Jalisco. Furthermore, ISSR analyzes indicated a high relative genetic diversity within the populations in terms of the percentage of polymorphisms, expected heterozygosity, and the rates of variation.

Keywords: *C. siamense*, multilocus phylogenetic analysis, ISSR, genetic diversity, pathogenicity tests.

1. INTRODUCCIÓN

La antracnosis en mango es una de las enfermedades más importantes que afectan a este cultivo a nivel mundial. El mayor impacto se da en la etapa de postcosecha, provocando pérdidas de hasta el 100% en zonas húmedas, ya que disminuye la producción y la calidad del fruto lo que tiene repercusiones en su comercialización (Ploetz, 2003). Varias especies del género *Colletotrichum* han sido reportadas como agentes causales de esta enfermedad a nivel mundial, mientras que en México se han identificado siete especies en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz, causando antracnosis en hojas, ramas y frutos de mango (Tovar-Pedraza *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020).

El estado de Jalisco se encuentra entre los principales productores de mango en el país y también contribuye en la cantidad de fruto para exportación. En años recientes se ha observado en huertas comerciales de mango del estado, la presencia de antracnosis en precosecha (cuando los frutos aún están en los árboles), lo cual no se había detectado anteriormente en esta zona. Sorprendentemente, algunas huertas presentan hasta 100% de incidencia con diferentes grados de severidad en los frutos (Ing. Rubén Ortega Arreola, comunicación personal, 12 de septiembre de 2018).

La aparición de antracnosis en mango en la etapa de precosecha se considera una situación extraordinaria, ya que es más común que esta enfermedad ocurra en postcosecha, reduciendo la vida de anaquel de este frutal. Es importante señalar que la alta incidencia y severidad de la enfermedad en algunas huertas, ha causado enorme preocupación entre los agricultores debido a que el daño en los frutos reduce su calidad e impide su exportación al extranjero, ocasionando pérdidas económicas. Actualmente se desconoce la identidad y diversidad de las especies de *Colletotrichum* que se encuentran en las huertas afectadas. El estudio molecular de las poblaciones de este patógeno proporcionará información que ayude a comprender mejor su biología y evolución para diseñar mejores estrategias de manejo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos botánicos y producción del mango.

El mango (*Mangifera indica* L.) pertenece al orden Sapindales, familia Anacardiaceae. Son árboles perennes de entre 10 y 30 m de altura. Forman inflorescencias ramificadas terminales con flores polígamas de color verde amarillento. El fruto es una drupa carnosa con uno o más embriones y las características en cuanto a tamaño, forma, color y sabor varían de acuerdo a los diferentes cultivares (Mukherjee y Litz, 2009).

El grupo de productos básicos que conforman el mango, el mangostán y la guayaba se encuentra en el tercer lugar de las frutas tropicales que más se comercializan a nivel mundial, excluyendo el plátano. Para el 2019, el volumen de exportación de estos productos fue de 27%, por debajo de la piña (40%) y el aguacate (28%), además, los valores unitarios de exportación de este grupo se incrementaron en 6% en comparación con el 2018 (FAO, 2020).

El principal país productor de mango, mangostán y guayaba es India con una producción de 24,748,000 t, seguido de Indonesia con 3,617,271 t y México con 2,373,111 t para el año 2020. No obstante, México es el principal país exportador de este grupo de frutas, aportando 421,636 t en el año 2020, seguido de Tailandia y Brasil con 391,280 t y 243,466 t, respectivamente (FAO, FAOSTAT, 2020).

El estado de Jalisco ocupa el séptimo lugar de producción de mango en el país, aportando 110,913.3 t (5.3% del total) con una superficie sembrada de 7,768.8 ha (3.9% del total). Tomatlán, Cihuatlán y La Huerta son los principales municipios productores de mango, aportando el 61.4%, 17.1% y 8.9%, respectivamente, de la producción en el estado de Jalisco (SIAP, 2020).

2.2 Enfermedades del mango.

El mango puede ser afectado por diversas enfermedades causadas por diferentes patógenos a lo largo de su desarrollo. Algunas de las enfermedades causadas por patógenos diferentes a hongos son: el cancro bacteriano (mancha negra bacteriana) causada por la bacteria *Xanthomonas citri* pv. *mangiferae-indicae*, que puede causar la caída prematura de frutos y la defoliación parcial del

árbol (Zombré *et al.*, 2015); también se han asociado nematodos como *Hemicriconemoides mangiferae* con la decadencia del mango, al inducir cambios fisiológicos que pueden debilitar a las plantas contra patógenos fúngicos de la raíz (Anwar *et al.*, 2012).

Sin embargo, diversos géneros de hongos causan las principales enfermedades de este frutal en el ámbito mundial. La antracnosis causada por diversas especies de *Colletotrichum* es una de las más importantes, ya que limita la producción, además de reducir la calidad del fruto (Arauz, 2000). Otra enfermedad importante distribuida en la mayoría de las áreas productoras es la malformación o escoba de bruja, la cual es causada por varias especies de *Fusarium* (Marasas *et al.*, 2006; Otero-Colina *et al.*, 2010). Enfermedades menos frecuentes son la marchitez causada por *Verticillium* spp., que invade las raíces causando un estrés hídrico resultando en una muerte lenta de la planta y la cenicilla causada por el hongo *Oidium* spp. que puede impedir la formación del fruto al infectar panículas y flores (Haggag, 2010).

2.3. Enfermedad de antracnosis en mango.

La antracnosis causada por especies del género *Colletotrichum* es una de las enfermedades más importantes del mango a nivel mundial. El mayor impacto ocurre en la etapa de postcosecha, provocando pérdidas de hasta el 100% en zonas húmedas, ya que disminuye la producción y la calidad del producto lo que tiene repercusiones en su comercialización (Ploetz, 2003). No obstante, existen otros patógenos que también causan lesiones, manchas y pudrición de frutos en postcosecha, tales como los hongos de la familia Botryosphaeriaceae, principalmente *Lasiodiplodia theobromae* y *L. pseudotheobromae*, que causan pudrición del pedúnculo; y *Alternaria alternata* que causa la mancha negra (Ploetz y Freeman, 2009), que a diferencia de *Colletotrichum*, ablandan el fruto creando una consistencia acuosa en las lesiones que también son de mayor tamaño.

2.4. Síntomas de antracnosis causados por *Colletotrichum*.

La antracnosis se ha reportado en México en todas las zonas productoras de mango, afectando al follaje, flores y frutos; no obstante, el daño postcosecha es el más importante (Benítez-Camilo *et al.*, 2003). Inicialmente, las lesiones en hojas se presentan como manchas pequeñas de color café a negro, que en condiciones apropiadas de humedad y temperatura pueden alargarse y coalescer formando lesiones irregulares expandiéndose hasta formar áreas necróticas grandes. La enfermedad en la panícula puede afectar tanto al tallo de la inflorescencia (manchones alargados de color gris a negro) como a las flores individuales (comienza como manchas pequeñas que se van expandiendo hasta que toda la flor se seca y queda de color negro). Los frutos que son infectados en la etapa inicial del desarrollo son abortados; los frutos grandes (principalmente los ya maduros) presentan una gran cantidad de lesiones pequeñas de color café oscuro o negro, se pueden formar en cualquier parte del fruto, pero normalmente se desarrollan desde la base del pedúnculo hacia el ápice del fruto. Las lesiones son superficiales afectando solo el epicarpio (cáscara), pero pueden penetrar al mesocarpio (pulpa) cuando una gran porción del fruto ha sido afectada (Arauz, 2000; Ploetz, 2009).

2.5. Especies de *Colletotrichum* que causan antracnosis.

A nivel mundial se han reportado 20 especies de *Colletotrichum* causando antracnosis en mango, *C. alienum*, *C. asianum*, *C. cliviicola*, *C. cordylinicola*, *C. endophytica*, *C. fioriniae*, *C. fructicola*, *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. grossum*, *C. kahawae*, *C. karstii*, *C. liaoningense*, *C. musae*, *C. queenslandicum*, *C. scovillei*, *C. siamense*, *C. simmondsii*, *C. theobromicola*, y *C. tropicale* (Tarnowski y Ploetz, 2008; Ismail *et al.*, 2015; Pardo-de la Hoz *et al.*, 2016; Shivas *et al.*, 2016; Manzano-León *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Tovar-Pedraza *et al.*, 2019).

En México, se han reportado siete especies de *Colletotrichum* causando antracnosis en ocho estados productores del país (Chiapas, Colima, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz). Las especies *C. gloeosporioides* y *C. queenslandicum* solo se han aislado a partir de frutos enfermos (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2001; Rojas-Martínez *et al.*, 2008; Honger *et al.*, 2014; Fuentes-Aragón

et al., 2020), mientras que *C. alienum*, *C. fructicola*, y *C. tropicale* se aislaron principalmente de hojas con síntomas (Tovar-Pedraza *et al.*, 2019); las especies *C. asianum* y *C. siamense* se aislaron de frutos y hojas (Honger *et al.*, 2014; Tovar-Pedraza *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020).

2.6. Aspectos del género *Colletotrichum*.

El género *Colletotrichum* fue descrito por Corda en 1831, es un ascomiceto de la clase Sorariomycetes, subclase Hypocreomycetidae, orden Glomerellales, familia Glomerellaceae (Carbú *et al.*, 2020). El género se compone de alrededor de 200 especies distribuidas en 13 complejos de especies (dos Santos-Vieira *et al.*, 2020), que pueden causar enfermedades como antracnosis, daño en las hojas, pudrición y caída de frutos en floración, en una amplia variedad de plantas herbáceas y leñosas (Cannon *et al.* 2012). Afecta a la mayoría de los cultivos y plantas ornamentales, principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Carbú *et al.*, 2020). En el reporte “State of the World’s Plants 2016”, *Colletotrichum* fue clasificado entre los diez principales patógenos fúngicos que afectan a las plantas en función de su importancia científica y económica (Willis y Bachman, 2016).

2.7. Caracterización genética de las especies de *Colletotrichum*.

Debido a la plasticidad y variación en los caracteres morfológicos inducidos por condiciones ambientales, el estudio de las especies de *Colletotrichum* se realiza por medio de técnicas moleculares. De esta manera, los aislados de este género se han agrupado en 13 complejos de especies utilizando las secuencias de múltiples genes en análisis filogenéticos (Marin-Felix *et al.*, 2017; dos Santos-Vieira *et al.*, 2020).

Por otro lado, el análisis de Secuencias Repetidas Simples Internas (ISSRs) se ha utilizado para estudiar la diversidad genética de aislados de *Colletotrichum* de mango, ya que se observa mayor variabilidad genética en términos del porcentaje de polimorfismos empleando estos marcadores moleculares (Sornakili *et al.*, 2017).

Diversos estudios han reportado altos niveles de variabilidad genética en términos del porcentaje de polimorfismos, contenido de información polimórfica,

distancia genética, genotipos multilocus y heterocigosidad esperada para especies como: *C. gloeosporioides* en aislados de papaya y cítricos (Rampersad, 2013; Moges *et al.*, 2016) y *C. falcatum* en aislados de caña de azúcar (Kumar *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2018), entre otros. En México, únicamente se han realizado estudios de diversidad en *C. gloeosporioides* en aislados de aguacate (Montero-Tavera *et al.*, 2010) y en *C. magnum* en aislados de papaya (Pérez-Brito *et al.*, 2018). Es importante indicar que, a la fecha, no se han reportado estudios sobre la diversidad genética de especies de *Colletotrichum* aisladas de mango en México, por lo que los resultados de esta investigación empleando análisis ISSRs, contribuirá al conocimiento sobre la diversidad genética y estructura poblacional de las especies de este patógeno que afecta al mango en la región centro occidente del país.

3. JUSTIFICACIÓN

En años recientes se ha observado un incremento en la severidad de la antracnosis durante la etapa de precosecha en huertas comerciales de mango en Jalisco. Una posibilidad es que este incremento en severidad se deba a la presencia de nuevas variantes genéticas en subpoblaciones de *Colletotrichum*. La información sobre la diversidad genética de especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en mango en México es escasa, por lo que el conocimiento generado en el presente estudio permitirá determinar las relaciones filogenéticas de las especies de *Colletotrichum* y su diversidad en Jalisco, lo cual ayudará a establecer mejores estrategias de manejo de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

La enfermedad de antracnosis en mango en etapa de precosecha en el estado de Jalisco es causada por diferentes especies del género *Colletotrichum*, las cuales presentan una alta diversidad genética intraespecífica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General.

Caracterizar genéticamente las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis en mango en el estado de Jalisco.

5.2. Objetivos Específicos.

- Identificar mediante un análisis multilocus las especies de *Colletotrichum* utilizando secuencias parciales de genes nucleares y ribosomales.
- Evaluar la patogenicidad de aislados de *Colletotrichum* asociados con antracnosis.
- Determinar la diversidad genética intraespecífica de los aislados de *Colletotrichum* mediante análisis de secuencias repetidas simples internas (ISSR).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colecta de frutos enfermos.

La colecta de los frutos con lesiones de antracnosis se llevó a cabo en cinco huertas productoras de mango de tres municipios en el estado de Jalisco, México, durante los días 12, 13 y 14 de septiembre de 2018 (Fig. 1). Se colectó un fruto con síntomas por árbol, utilizando un muestreo completamente al azar a lo largo de la huerta. Los frutos se cortaron directamente de los árboles, se guardaron en bolsas de plástico marcadas y se almacenaron en un contenedor de plástico con hielo para su transporte al laboratorio.



Figura 1. Mapa de los sitios donde se colectaron los frutos de mango con antracnosis.

Colecta Sitio 1. La huerta se localiza en el municipio de Cihuatlán, con las coordenadas geográficas N 19°15'48.7" y O 104°41'36.9", el lugar tiene el nombre de Jaluco y su propietario se llama Héctor Medina. En esta huerta de mango se cultiva la variedad Keitt. De acuerdo al propietario las lesiones se comenzaron a observar hace aproximadamente 10 años con incidencia del 100% (al menos un fruto con síntomas por árbol). Se colectaron 12 mangos con síntomas.

Colecta Sitio 2. La huerta se localiza en el municipio de Cihuatlán, con las coordenadas geográficas N 19°15'44.1" y O 104°41'18.7", huerta colindante al primer sitio, en Jaluco, cuyo propietario es Juan Padilla. La variedad de mango que se siembra es Keitt y también presenta la enfermedad en todos los árboles. Se colectaron 17 mangos con síntomas.

Colecta Sitio 3. El sitio se ubica en el municipio de La Huerta con las coordenadas geográficas N 19°30'36.9" y O 104°34'3.6". El nombre de la huerta es Rancho Los Cascabeles y se cultiva mango Kent, su propietario se llama Adrián Rodríguez Vázquez. Se colectaron 6 mangos con síntomas.

Colecta Sitio 4. El sitio se ubica en el municipio de La Huerta con las coordenadas geográficas N 19°30'41.6" y O 104°34'1.3". El nombre de la huerta es Agua Caliente y se cultiva mango Keitt. Ésta es una huerta aledaña a la del sitio 3 y su propietario es Isabel González Navarro. Se colectaron 10 mangos con síntomas.

Colecta Sitio 5. La huerta se localiza en el municipio de Tomatlán con las coordenadas geográficas N 19°40'45.3" y O 105°12'22.3". La huerta está en el Rancho Olvido y cuyo propietario se llama Jorge Sánchez Vázquez. Se tienen mangos principalmente de la variedad Kent, algunos de la variedad Keitt y además hay plantaciones de aguacate, tamarindo y guayaba.

6.2. Aislamiento de hongos.

El aislamiento de los hongos asociados con las lesiones en los frutos se llevó a cabo primero desinfestando la superficie de los frutos, los cuales se lavaron con detergente en polvo diluido en agua al 1%, tallando suavemente la superficie con una fibra, después se enjuagaron con agua estéril, se dejaron secar y a continuación se flamearon, asperjando el fruto con alcohol al 100% y encendiendo el alcohol con fuego hasta que se consumiera. Posteriormente, se cortaron explantes de 5 mm² del pericarpio en la periferia de las lesiones, incluyendo tejido enfermo y tejido sin síntomas; adicionalmente, se tomaron muestras del mesocarpio en el área cubierta por las lesiones. Los explantes se sembraron en cajas de Petri (100 x 15 mm) con medio agar papa-dextrosa (PDA, Bioxon) suplementado con 0.7 g de ampicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 10 mg de rifampicina por litro (Sigma-Aldrich), y se

incubaron a 26 °C por 24 a 48 h. Las colonias fúngicas que emergieron de los explantes se transfirieron a cajas con agar agua 2%, donde se purificaron mediante la técnica de transferencia de una punta de hifa a cajas con medio PDA. Los aislados purificados se cultivaron a 26 °C por 7 días. Discos de medio y micelio de cada uno de los aislados se almacenaron en microtubos estériles de 1.5 mL, con agua desionizada estéril a 10 °C, en la colección Micológica del Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, UMSNH.

6.3. Obtención de ADN genómico.

Micelio de diez días de crecimiento en medio PDA se recuperó en microtubos de 1.5 mL (Axygen), se deshidrató a 37 °C por 24 h y se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El ADN genómico se extrajo utilizando un procedimiento con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, Sigma-Aldrych, St. Louis, MO) descrito por Leslie y Summerell (2006) con modificaciones; el micelio molido fue incubado en buffer de lisis a 65 °C por una hora, se incubó a 37 °C con la enzima RNAsa y la pastilla de ADN se lavó con etanol absoluto y posteriormente con etanol al 70%.

6.4. Amplificación por PCR de secuencias parciales.

Las secuencias parciales de la región ribosomal de los espaciadores transcritos internos (ITS) [615 pb], y la región nuclear del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*gpdh*) [308 pb], se obtuvieron por PCR usando los oligonucleótidos indicados en la Cuadro 1. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler Gradient, USA), donde cada reacción contenía 1.2 µL del ADN genómico a una concentración de 30 ng/µL, 6.25 µL de master mix (Go Taq® G2 Hot Start Colorless Master Mix 2X, Promega), 0.0675 µL de cada oligonucleótido a una concentración de 100 pmol y 5.415 µL de agua grado biología molecular, obteniendo un volumen final de 13 µl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94 °C por 1 min), hibridación [Temperatura de Fusión (T_m) de los oligonucleótidos (Cuadro 1) por 1 min], y extensión (72 °C por 1 min). La reacción finalizó con un paso de extensión a 72 °C por 7 min. Los

fragmentos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1% y las bandas de interés se cortaron y purificaron con un kit comercial (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Los productos de PCR purificados se enviaron a una compañía externa (Macrogen, Seúl, Corea del Sur) para la secuenciación del ADN amplificado.

Cuadro 1. Características de los oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones nuclear y ribosomal analizadas en este estudio.

Gen	Región amplificada	Oligonucleótido*	Secuencia	Tm°
ITS	Espaciador transcrito	ITS5 ^a	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	52
ADNr	interno	ITS4 ^a	TCCTCCGCTTATTGATATGC	52
GPDH	Gliceraldehido 3-	GDF1 ^b	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	60
	fosfato deshidrogenasa	GDR1 ^b	GGGTGGAGTCGTACTIONGAGCATGT	60

* Oligonucleótidos utilizados: ^aWhite *et. al.*, 1990; ^bGuerber *et. al.*, 2003.

6.5. Análisis BLAST.

Se generaron secuencias consenso utilizando los programas Gap5 y Pregap4 de Staden Package (Bonfield y Whitwham, 2010). Estas secuencias se analizaron en el programa BLAST [NCBI. National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)] para determinar los porcentajes de similitud e identificar los aislados.

6.6. Análisis filogenéticos.

El análisis filogenético se realizó utilizando las secuencias parciales de las regiones ITS y ApMat (espaciador intergenético entre los genes Apn2 y Mat1-1-1), así como, los genes *gpdh*, *act* (Actina), *tub2* (β -Tubulina), *gs* (Glutamina Sintasa), *chs-1* (Quitina sintasa) de 35 aislados pertenecientes a 17 especies del complejo *C. gloeosporioides* (Cuadro 2), reportadas en el estudio de Fuentes-Aragón *et al.*, (2020), esto con la finalidad de resolver el clado de *C. siamense*, a pesar de que sólo se utilizaron las dos regiones amplificadas (ITS y *gpdh*) para los aislados de este trabajo.

Las secuencias se alinearon con MUSCLE, se editaron manualmente y se excluyeron bloques donde no fue posible alinear las secuencias. Posteriormente se construyó una matriz concatenada estableciendo las particiones por gen (la región ITS se separó en dos subregiones, ITS1 e ITS2). Las relaciones filogenéticas se estimaron con los criterios de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB).

La MV se realizó en raxmlGUI (Edler *et al.*, 2020) usando el modelo evolutivo GTR+G+I, el soporte de los nodos fue determinado por valores bootstrap de 1000 réplicas. La IB se realizó en MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012), se corrieron cuatro MCMC (Markov Chain Monte Carlo) simultáneamente, comenzando con árboles aleatorios para 10,000,000 de generaciones, los cuales se muestrearon cada 100 generaciones, obteniendo un total de 100,000 árboles, de los cuales los árboles obtenidos en el 25% de las generaciones iniciales se descartaron en el “burn-in”, procedimiento para evitar reconstrucciones con baja probabilidad posterior. Se garantizó la convergencia entre los valores de los parámetros estimados por los diferentes análisis en paralelo, observando la Magnitud del Muestreo Efectivo (ESS, por sus siglas en inglés), donde valores mayores a 200 representan un buen muestreo y valores menores a 200 representan un muestreo deficiente, utilizando el programa Tracer v. 1.7.2 (Rambaut *et al.*, 2018). Los árboles fueron enraizados con *Colletotrichum endophytica* CAUG28, en concordancia a su posición en la topología estimada en el estudio de Fuentes-Aragón *et al.*, (2020).

Cuadro 2. Aislados de *Colletotrichum* que se utilizaron en el análisis filogenético y números de accesoión del GenBank de siete regiones y genes nucleares y ribosomales.

Especie	Código de aislado	Hospedante	País	GenBank						
				ITS	<i>gpdh</i>	<i>act</i>	<i>tub2</i>	<i>ApMat</i>	<i>gs</i>	<i>chs-1</i>
<i>C. aenigma</i>	ICMP18608*	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010244	JX010044	JX009443	JX010389	KM360143	JX010078	JX009774
<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP17673*	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	JX010176	JX009930	JX009483	JX010392	KM360145	JX010081	JX009799
<i>C. alienum</i>	ICMP12071*	<i>Malus domestica</i>	Nueva Zelanda	JX010251	JX010028	JX009572	JX010411	KM360144	JX010101	JX009882
<i>C. asianum</i>	CBS130418*	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	FJ972612	JX010053	JX009584	JX010406	FR718814	JX010096	JX009867
<i>C. asianum</i>	MTCC11680	<i>Mangifera indica</i>	India	JQ894679	JQ894623	JQ894545	JQ894601	JQ894554	—	JQ894616
<i>C. asianum</i>	ICMP18696	<i>M. indica</i>	Australia	JX010192	JX009915	JX009576	JX010384	—	JX010073	JX009753
<i>C. asianum</i>	CPO27.113	<i>M. indica</i>	México	MK955379	MK948835	MK948792	—	—	MK948812	MK948802
<i>C. asianum</i>	CPO27.249	<i>M. indica</i>	México	MK955380	MK948836	MK948793	MK948821	—	—	MK948803
<i>C. asianum</i>	CPO27.299	<i>M. indica</i>	México	MK955381	MK948837	MK948794	—	—	MK948813	MK948804
<i>C. chrysophilum</i>	CMM4268*	<i>Musa sp.</i>	Brasil	KX094252	KX094183	KX093982	KX094285	KX094325	KX094204	KX094083
<i>C. chrysophilum</i>	CPO27.240	<i>M.-indica</i>	Mexico	MK955382	MK948838	MK948795	MK948822	MK948829	MK948814	MK948805
<i>C. conoides</i>	CAUG17	<i>Capsicum annum</i>	China	KP890168	KP890162	KP890144	KP890174	—	—	KP890156
<i>C. endophytica</i>	CAUG28	<i>C. annum</i>	China	KP145441	KP145413	KP145329	KP145469	—	—	KP145385
<i>C. fructicola</i>	CBS130416*	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX010165	JX010033	FJ907426	JX010405	JQ807838	JX010095	JX009866
<i>C. fructicola</i>	LC2923	<i>C. sinensis</i>	China	KJ955083	KJ954784	KJ954365	KJ955232	KJ954499	KJ954934	—
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS112999*	<i>Citrus sinensis</i>	Italia	JQ005152	JX010056	JX009531	JX010445	JQ807843	JX010085	JX009818
<i>C. gloeosporioides</i>	LF318	<i>C. sinensis</i>	China	KJ955127	KJ954828	KJ954407	KJ955275	KJ954541	KJ954978	—
<i>C. hebeiense</i>	JZB330024	<i>Vitis vinifera</i>	China	KF156873	KF377505	KF377542	—	KF377573	—	—
<i>C. hebeiense</i>	JZB330028	<i>V. vinifera</i>	China	KF156863	KF377495	KF377532	KF288975	KF377562	—	KF289008
<i>C. musae</i>	CBS116870*	<i>Musa sp.</i>	USA	JX010146	JX010050	JX009433	HQ596280	KC888926	JX010103	JX009896

<i>C. nupharicola</i>	ICMP18187*	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>Polysepala</i>	USA	JX010187	JX009972	JX009437	JX010398	JX145319	JX010088	JX009835
<i>C. queenslandicum</i>	ICMP1778*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX010276	JX009934	JX009447	JX010414	KC888928	JX010104	JX009899
<i>C. queenslandicum</i>	CPO27.261	<i>M. indica</i>	México	MK955384	MK948840	MK948797	MK948824	MK948830	MK948816	MK948807
<i>C. salsolae</i>	ICMP19051*	<i>Salsola tragus</i>	Hungría	JX010242	JX009916	JX009562	JX010403	KC888925	JX010093	JX009863
<i>C. salsolae</i>	CBS119296	<i>Glycine max</i>	Hungría	JX010241	JX009917	JX009559	—	—	—	JX009791
<i>C. siamense</i>	CBS130417*	<i>C. arabica</i>	Tailandia	JX010171	JX009924	FJ907423	JX010404	JQ899289	JX010094	—
<i>C. siamense</i>	LF182	<i>Camellia sp.</i>	China	KJ955093	KJ954794	KJ954375	KJ955242	KJ954509	KJ954944	—
<i>C. siamense</i>	MTCC11672	<i>M. indica</i>	India	JQ894653	JQ894624	JQ894533	JQ894594	JQ894556	—	JQ894608
<i>C. siamense</i>	ICMP12567	<i>P. americana</i>	Australia	JX010250	JX009940	JX009541	JX010387	—	JX010076	JX009761
<i>C. siamense</i>	CPO27.256	<i>M. indica</i>	México	MK955387	MK948843	MK948800	MK948827	MK948833	MK948819	MK948810
<i>C. siamense</i>	CPO27.26	<i>M. indica</i>	México	MK955388	MK948844	MK948801	MK948828	MK948834	MK948820	MK948811
<i>C. tropicale</i>	CMM 4243	<i>Musa sp.</i>	Brasil	KU213603	KU213601	KU213596	KU213604	KU213597	KU213602	KU213600
<i>C. tropicale</i>	CBS 124949, MTCC11371*	<i>T. cacao</i>	Panamá	JX010264	JX010007	JX009489	JX010407	KC790728	JX010097	JX009870
<i>C. viniferum</i>	GZAAS5.08608	<i>Vitis vinifera</i>	China	JN412802	JN412800	JN412793	—	—	JN412784	—
<i>C. viniferum</i>	GZAAS5.08601	<i>V. vinifera</i>	China	JN412804	JN412798	JN412795	—	—	JN412787	—

* Aislados holotipo

- Secuencias no encontradas

6.7. Pruebas de patogenicidad.

Debido a la poca disponibilidad de frutos de mango a lo largo del año y al posible desarrollo de lesiones en los frutos causadas por infecciones quiescentes; se decidió probar la patogenicidad de los aislados en hojas de mango, las cuales están disponibles todo el año (Mo et al., 2018; Tovar-Pedraza et al., 2019).

6.7.1. Ensayo preliminar. Se realizó un análisis preliminar para determinar el tipo de inoculación que se utilizaría en las pruebas de patogenicidad posteriores. Se colectaron hojas de un árbol sano variedad Ataúlfo en el municipio de Morelia (19°41'52.9" N, 101°09'57.8" O). Las hojas se lavaron con agua jabonosa, se enjuagaron con agua destilada estéril, y se asperjaron con alcohol al 70%. La inoculación se llevó a cabo siguiendo cuatro tratamientos (suspensión de conidios o discos con micelio y con herida o sin herida). Se utilizaron tres aislados de *Colletotrichum* (MXJAL-448, MXJAL-493, MXJAL-505) y el control negativo se inoculó con agua desionizada estéril, en total se utilizaron 48 hojas, tres por cada cepa para cada tratamiento (Cuadro 3). Se realizaron seis inoculaciones por hoja a lo largo de la lámina (tres de cada lado del raquis), se inocularon 10 µL de suspensión de conidios (o un disco con micelio) sobre la hoja intacta (sin herida) o sobre una punción hecha con una lanceta (con herida). Las hojas se colocaron en cámaras húmedas por separado y se incubaron a 25 °C con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, después de 24 h se retiraron los discos.

Cuadro 3. Tratamientos utilizados en el ensayo preliminar de las pruebas de patogenicidad.

	Con herida			Sin herida				
Suspensión de conidios	Control	448	493	505	Control	448	493	505
Discos con micelio	Control	448	493	505	Control	448	493	505

6.7.2. Pruebas en frutos y hojas de mango Keitt. Se realizó un ensayo para comparar la virulencia de los aislados de *Colletotrichum* inoculando frutos de la variedad Keitt y hojas del mismo árbol. Los 14 aislados utilizados se seleccionaron aleatoriamente (MXJAL-448, MXJAL-450, MXJAL-455, MXJAL-457, MXJAL-463, MXJAL-467, MXJAL-468, MXJAL-470, MXJAL-475, MXJAL-478, MXJAL-484, MXJAL-488, MXJAL-493, MXJAL-498).

6.7.2.1. Colecta de frutos y hojas. Los frutos y hojas se colectaron de un árbol de mango sano variedad Keitt en el municipio de Apatzingán (19°1'27.785" N, 102°17'25.405" O). Se cortó la punta de las ramas con 10 hojas aproximadamente (para evitar la marchitez rápida de las hojas), las cuales se colocaron en bolsas de plástico. Adicionalmente se colectaron frutos directamente del árbol y se colocaron en bolsas de plástico. Todas las muestras se transportaron y almacenaron a 26 °C.

6.7.2.2. Preparación del inóculo. Los aislados se cultivaron en cajas Petri con PDA fresco con pedazos de hojas de mango (para incrementar la esporulación) a 26 °C por 10 días. Se obtuvieron suspensiones de conidios de cada aislado utilizando agua desionizada estéril para lavar el micelio. Se determinó la concentración de conidios usando una cámara de Neubauer, y las suspensiones se ajustaron a la concentración de 1×10^6 conidios/mL.

6.7.2.2. Inoculación de frutos. Las pruebas de patogenicidad en frutos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Fuentes-Aragón *et al.* (2020) con modificaciones. Los frutos se desinfestaron lavando el epicarpio con agua jabonosa al 1% tallando suavemente con una fibra, se enjuagaron con agua estéril y se dejaron secar a 26 °C. Posteriormente se asperjaron con alcohol al 70%, se dejó evaporar el alcohol, y ya secos se colocaron en contenedores de plástico (dos frutos por contenedor) con una base de toallas húmedas (para mantener la humedad), sobre cajas de Petri (para evitar el contacto directo con el agua). Se inocularon cuatro gotas de 10 µL de la suspensión de conidios en regiones opuestas con heridas y sin heridas del mismo fruto. El control negativo se inoculó con agua desionizada estéril. Después de 24 h se retiró la tapa de los contenedores y los frutos se mantuvieron a 26 °C con un fotoperiodo de 8/16 h luz/oscuridad durante siete días.

6.7.2.4. Inoculación de hojas. Las pruebas de patogenicidad en hojas se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Mo *et al.* (2018) con modificaciones. Las hojas se desinfestaron de la misma manera que los frutos. Una vez que las hojas estaban secas se colocaron en contenedores de plástico (tres hojas por contenedor) que tenían una base de 1 cm de perlita estéril con agua (para mantener alta humedad), sobre plataformas de unicel (para evitar el contacto directo con el agua). Después se inocularon seis gotas de 10 μ L a lo largo de la lámina en diferentes hojas sin heridas y con heridas (tres de cada uno). El control negativo se inoculó con agua desionizada estéril. Las hojas inoculadas se mantuvieron en cámara húmeda a 26 °C con un fotoperiodo de 8/16 h luz/oscuridad durante siete días.

6.7.3. Pruebas en hojas de mango Keitt. Se utilizaron hojas para probar la patogenicidad de los 50 aislados de *Colletotrichum* faltantes, ya que en el experimento anterior se comprobó que reproducen los síntomas de antracnosis observados en campo tanto en frutos como en hojas. La metodología utilizada fue la misma que en el experimento anterior (a excepción de la inoculación en frutos).

6.8. Análisis de secuencias repetidas simples internas (ISSR).

Los análisis ISSR se realizaron utilizando cinco oligonucleótidos (GACA)₄ [Tm=48°C], (CAG)₅ [Tm=60°C], (TCC)₅, (AG)₈T y (GA)₈T [Tm=50°C] probados por Sornakili *et al.* (2017) en el estudio de diversidad genética de *C. gloeosporioides*. En un estudio preliminar para determinar reproducibilidad y estandarizar la técnica se probaron los oligonucleótidos con una selección de ocho aislados de *C. siamense*. Posteriormente, se completaron los ISSRs para los 62 aislados de *C. siamense*.

Las reacciones de PCR contenían 1.2 μ L del ADN genómico a una concentración de 30 ng/ μ L, 3.9 μ L de master mix (2.574 μ L de buffer incoloro 5x, 1.053 μ L MgCl₂ 25mM, 0.273 μ L Mix de nucleótidos 10mM c/u), 0.065 μ L de enzima polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Polymerase, Promega), 0.0675 μ L del oligonucleótido a una concentración de 100 pmol y 7.7675 μ L de agua grado

biología molecular, obteniendo un volumen final de 13 μ l. El PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, T_m del oligonucleótido por 1 min, y 72 °C por 2 min, finalizando con un paso de extensión a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron en un trans-iluminador UVP, las imágenes fueron capturadas con un equipo Kodak® EDAS-290.

6.9. Análisis de datos de los ISSRs y diversidad genética.

A partir de los patrones de bandas se realizó una matriz binaria (presencia = 1, ausencia = 0) con los tamaños moleculares de cada banda. Los índices de diversidad genética para cada población (diferentes huertas) se evaluaron de forma preliminar con el software GenAlEx v.6.5 (Peakall y Smouse, 2006), incluyendo la prueba aislamiento de distancias de Mantel con 999 permutaciones (Mantel, 1967).

Análisis complementarios de diversidad genética descritos a continuación se realizaron con el paquete de R poppr v.2.9.3 (Kamvar *et al.*, 2014). Las huellas genéticas de cada aislado se combinaron para generar su respectivo genotipo multilocus (MLG). Se puso a prueba si los alelos se recombinan libremente o si ha ocurrido reproducción clonal, con la estimación del desequilibrio de ligamiento (LD) utilizando el índice de asociación estandarizado (r_d) con 999 permutaciones (Agapow y Burt, 2001). Una vez que se determinó el nivel de desequilibrio de ligamiento, se corrigió el conjunto de datos. Con los datos corregidos, se calcularon el índice de Shannon-Wiener y la heterocigosidad esperada. También, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con 999 permutaciones, para estimar la partición de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones. A continuación, para evaluar la relación entre MLG, se construyó una red de expansión mínima con distancia genética basada en la disimilitud relativa (Kamvar *et al.*, 2014).

La estructura genética no jerárquica de los datos para asignar el número óptimo de grupos genéticos (K) se exploró con el método de agrupamiento bayesiano, utilizando un modelo de mezcla implementado en Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Para ello se ejecutaron 10 corridas independientes para

cada K (valores de K que van desde 1 hasta el número total de poblaciones muestreadas). Cada corrida independiente constó de 1,000,000 MCMC (Markov chain Monte Carlo) con un periodo de “burn-in” de 150,000 generaciones. El resultado del procedimiento anterior se interpretó con el criterio sugerido por Evanno et al. (2005) mediante el uso de Structure Harvester (Earl y Bridgett, 2012).

7. RESULTADOS

7.1. Síntomas de antracnosis en campo.

Los frutos afectados en las huertas presentaban manchas oscuras de consistencia dura y seca, de diferentes tamaños, que podían estar localizados en una parte del fruto o cubrirlo casi por completo. Algunas lesiones penetraban al mesocarpio y otras solo dañaban el epicarpio.

7.2. Aislamiento de hongos.

Se recuperaron 80 aislados de 51 mangos con síntomas de antracnosis. La mayoría de los aislados (N = 55) se obtuvieron de lesiones en el epicarpio, mientras que aproximadamente un tercio (N = 25) del total de los aislados se obtuvieron del mesocarpio (Cuadro 4). Se obtuvieron 21 aislados (14 epicarpio y 7 mesocarpio) en la huerta de Jaluco1, en Jaluco2 fueron 28 (17 epicarpio y 11 mesocarpio), en el Rancho los Cascabeles se recuperaron 10 aislados (6 epicarpio y 4 mesocarpio), en la huerta de Agua Caliente fueron 14 (12 pericarpio y 2 mesocarpio) y, por último, del Rancho Olivo se obtuvieron siete aislados (6 epicarpio y 1 mesocarpio).

7.3. Identificación del género de los aislados con análisis BLAST.

Análisis BLAST utilizando secuencias ITS mostró que 64 aislados presentaron 100% de identidad y cobertura con secuencias de *Colletotrichum*. Los otros 16 aislados correspondieron a los géneros: *Lasiodiplodia* (N = 4), *Pestalotiopsis* (N = 3), *Cladosporium* (N = 1), *Curvularia* (N = 1), *Cytospora* (N = 1), *Diaporthe* (N = 1), *Exserohilum* (N = 1), *Guignardia* (N = 1), *Nigrospora* (N = 1), *Penicillium* (N = 1), y *Phyllosticta* (N = 1).

Cuadro 4. Aislados recuperados de mangos de la variedad Kent con antracnosis en tres municipios del estado de Jalisco.

Cod. LABPV	Municipio	Huerta	Sitio	Árbol	Muestra	Aislado	Especie
MXJAL-435	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	4	4	Epicarpio	<i>Colletotrichum siamense</i>
MXJAL-436	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	5	5	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-437	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	5	5	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-438	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	6	6	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-439	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	6	6	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-440	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	7	7	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-441	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	7	7	Mesocarpio	<i>Cytospora</i> sp.
MXJAL-442	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	9	9	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-443	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	9	9	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-444	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	11	11	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-445	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	12	12	Epicarpio	<i>Cladosporium</i> sp.
MXJAL-446	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	12	12	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-447	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	15	15	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-448	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	15	15	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-449	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	16	16	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-450	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	17	17	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-451	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	18	18	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-452	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	18	18	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-453	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	19	19	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-454	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	19	19	Epicarpio	<i>Diaporthe</i> sp.
MXJAL-455	Cihuatlán	Jaluco huerta 1	1	19	19	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-456	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	2	2	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-457	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	3	3	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-458	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	3	3	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-459	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	4	4	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-460	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	4	4	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>

MXJAL-461	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	6	6	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-462	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	7	7	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-463	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	8	8	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-464	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	8	8	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-465	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	9	9	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-466	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	9	9	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-467	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	10	10	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-468	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	11	11	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-469	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	12	12	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-470	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	13	13	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-471	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	13	13	Mesocarpio	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
MXJAL-472	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	14	14	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-473	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	14	14	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-474	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	15	15	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-475	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	15	15	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-476	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	16	16	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-477	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	16	16	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-478	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	17	17	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-479	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	17	17	Mesocarpio	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
MXJAL-480	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	19	19	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-481	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	19	19	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-482	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	20	20	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-483	Cihuatlán	Jaluco huerta 2	2	20	20	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-484	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	2	2	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-485	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	2	2	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-486	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	4	4	Epicarpio	<i>C. asianum</i>
MXJAL-487	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	4	4	Mesocarpio	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
MXJAL-488	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	5	5	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-489	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	5	5	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>

MXJAL-490	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	6	6	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-491	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	7	7	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-492	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	7	7	Mesocarpio	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
MXJAL-493	La Huerta	Rancho Los Cascabeles	3	10	10	Epicarpio	<i>C. asianum</i>
MXJAL-494	La Huerta	Agua Caliente	4	1	1	Epicarpio	<i>Exserohilum</i> sp.
MXJAL-495	La Huerta	Agua Caliente	4	4	4	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-496	La Huerta	Agua Caliente	4	6	6	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-497	La Huerta	Agua Caliente	4	7	7	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-498	La Huerta	Agua Caliente	4	7	7	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-499	La Huerta	Agua Caliente	4	8	8	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-500	La Huerta	Agua Caliente	4	8	8	Mesocarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-501	La Huerta	Agua Caliente	4	9	9	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-502	La Huerta	Agua Caliente	4	9	9	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-503	La Huerta	Agua Caliente	4	10	10	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-504	La Huerta	Agua Caliente	4	11	11	Epicarpio	<i>Penicillium</i> sp.
MXJAL-505	La Huerta	Agua Caliente	4	12	12	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-506	La Huerta	Agua Caliente	4	12	12	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-507	La Huerta	Agua Caliente	4	13	13	Epicarpio	<i>C. siamense</i>
MXJAL-508	Tomatlán	Rancho Olvido	7	6	Ataulfo	Epicarpio	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
MXJAL-509	Tomatlán	Rancho Olvido	7	6	Ataulfo	Mesocarpio	<i>Curvularia</i> sp.
MXJAL-510	Tomatlán	Rancho Olvido	7	1	1	Epicarpio	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
MXJAL-511	Tomatlán	Rancho Olvido	7	2	2	Epicarpio	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
MXJAL-512	Tomatlán	Rancho Olvido	7	3	3	Epicarpio	<i>Nigrospora</i> sp.
MXJAL-513	Tomatlán	Rancho Olvido	7	4	4	Epicarpio	<i>Guignardia</i> sp.
MXJAL-514	Tomatlán	Rancho Olvido	7	5	5	Epicarpio	<i>Phyllosticta</i> sp.

7.4. Análisis filogenético de los aislados de *Colletotrichum*.

Inicialmente, se realizó un análisis filogenético preliminar con 115 secuencias parciales de ITS y *gpdh* reportadas por Cannon *et al.* (2012), observándose que los 64 aislados de *Colletotrichum* de este estudio se agruparon en el complejo de especies de *C. gloeosporioides*, pero con soportes de ramas muy bajos (<80). Además, del total de aislados recuperados, 24 secuencias resultaron ser idénticas a las de otros aislados (Cuadro 5) por lo que se retiraron del análisis, dejando una secuencia de cada grupo. Por lo tanto, para mejorar el soporte de las ramas se utilizaron solo las secuencias de 40 aislados obtenidas, además de las secuencias parciales de siete genes nucleares y ribosomales del complejo de especies de *C. gloeosporioides* reportadas por Fuentes-Aragón *et al.* (2020).

Cuadro 5. Cepas cuyas secuencias parciales de la región ITS y el gen *gpdh* son idénticas entre sí.

Grupos de cepas
MXJAL-438 , MXJAL-439, MXJAL-443, MXJAL-447, MXJAL-468
MXJAL-448 , MXJAL-449, MXJAL-453, MXJAL-456, MXJAL-457, MXJAL-458, MXJAL-484, MXJAL-485
MXJAL-450 , MXJAL-461, MXJAL-462
MXJAL-451 , MXJAL-452, MXJAL-463, MXJAL-464, MXJAL-466, MXJAL-478
MXJAL-460 , MXJAL-467
MXJAL-482 , MXJAL-490, MXJAL-491
MXJAL-488 , MXJAL-498, MXJAL-501, MXJAL-507

Negritas: Cepas que se incluyeron en el análisis filogenético

El árbol filogenético obtenido presenta agrupaciones similares dentro de los complejos de especies como las observadas en el artículo de Fuentes-Aragón *et al.* (2020), además, los clados donde se agrupan los aislados de este estudio para identificarlos a especie tienen buenos soportes bootstrap y probabilidades posteriores (>55/0.6, respectivamente) (Fig. 2A), aunado a esto, se obtuvieron valores de muestreo efectivo para todos los parámetros por arriba de 200, lo cual indica que se realizó un buen muestreo. De acuerdo con lo observado, 62 de los aislados pertenecen a la especie *C. siamense* (Fig. 2B), mientras que los otros dos

aislados son de la especie *C. asianum* (MXJAL-486, MXJAL-493) (Fig.2C). No se identificó a *Colletotrichum* entre los aislados del municipio de Tomatlán.

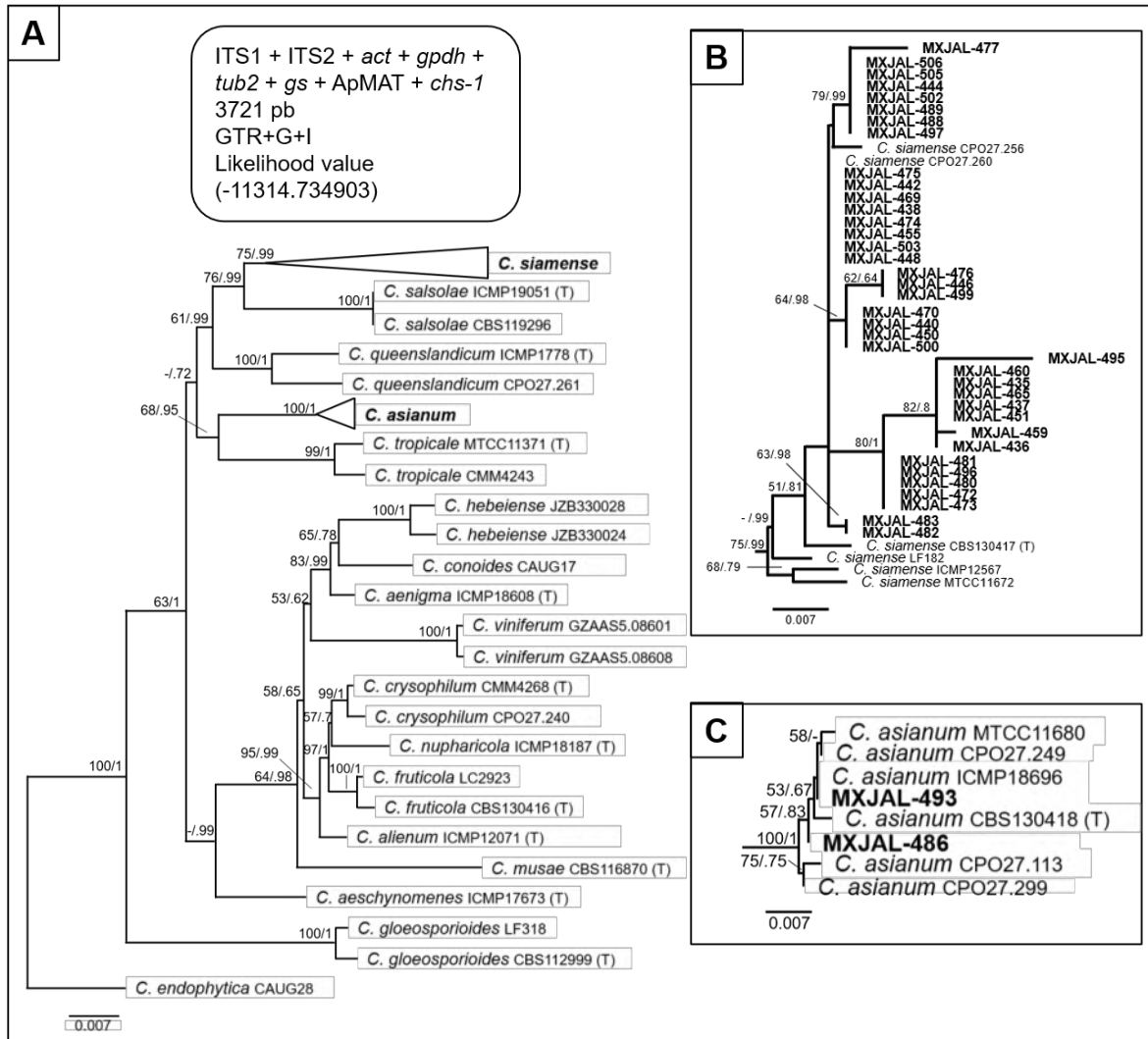


Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con ocho regiones y genes de 75 aislados de *Colletotrichum*. Se colapsaron las ramas de los clados donde se agrupan los aislados (A). B, clado de *C. siamense*; C, clado de *C. asianum*. Los valores bootstrap (VB) y las probabilidades posteriores (PP) por arriba de 50/0.5, se muestran arriba de los nodos (VB/PP). Negritas = aislados de este trabajo. T = Aislados holotipo.

7.5. Pruebas de patogenicidad.

7.5.1. Ensayo preliminar. Las hojas mostraron síntomas de antracnosis tres días después de la inoculación cuando se realizó una herida y en siete días cuando no se hizo herida. Además, se determinó que la inoculación utilizando suspensión de conidios produce mejores resultados, con o sin heridas, a diferencia de la inoculación con disco donde se producen significativamente menos lesiones cuando no se hace una punción (Kruskal-Wallis $\chi^2 = 13.604$, $gl = 3$, $p\text{-value} = 0.003497$). Por esta razón, además de que es un método más parecido a lo que ocurre en la naturaleza se decidió utilizar una suspensión de conidios, como fuente de inóculo.

7.5.2. Pruebas en frutos y hojas de mango Keitt. Los 14 aislados produjeron síntomas de antracnosis similares a los observados en campo, 3 ó 4 días después de las inoculaciones (Fig. 3). Todos los aislados causaron lesiones en las inoculaciones con herida en frutos y hojas. Mientras que solo 10 aislados causaron lesiones en las inoculaciones sin herida (Cuadro 6). Tomando en cuenta estos resultados se decidió utilizar solo hojas de mango para probar la patogenicidad de los 50 aislados restantes.

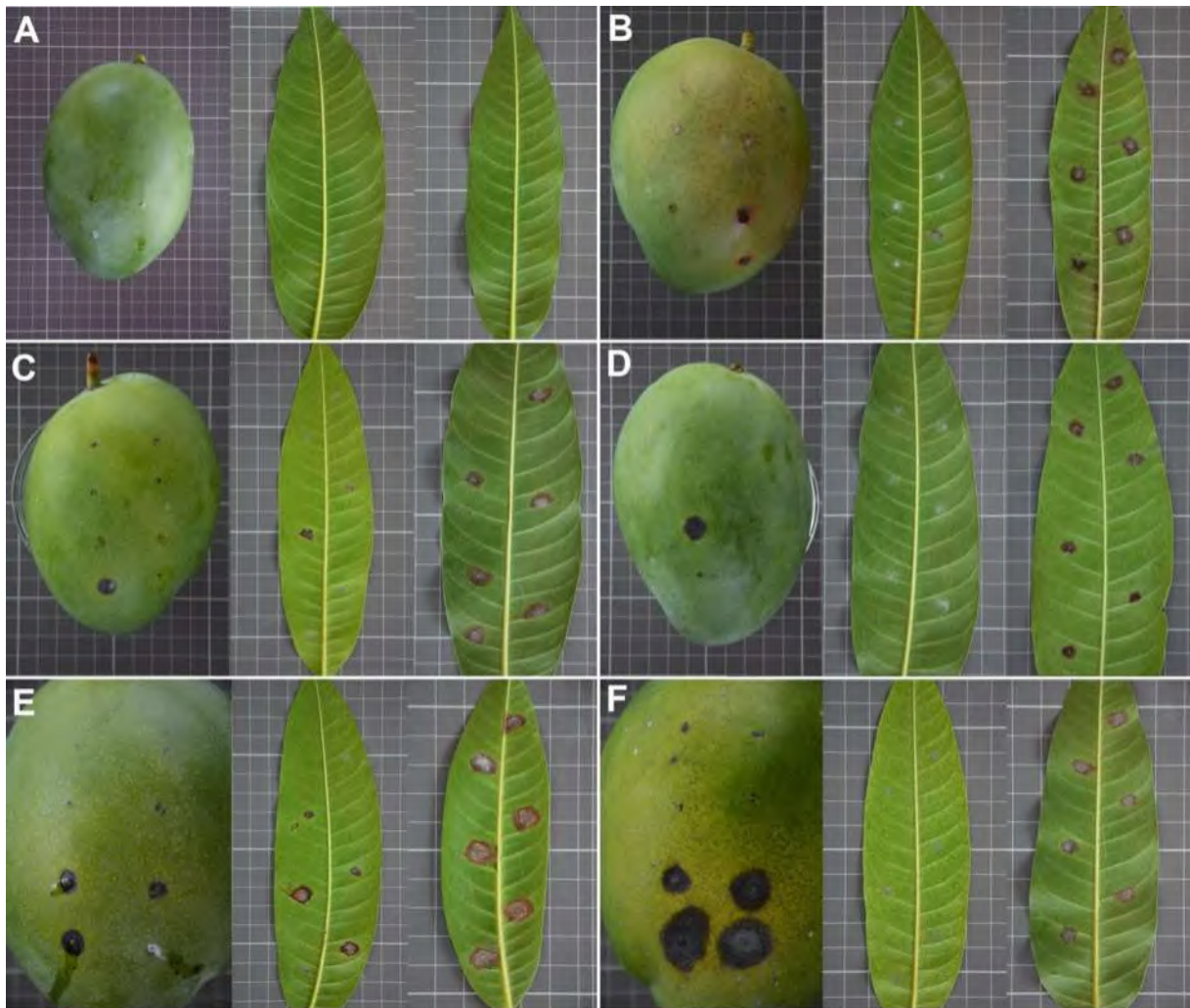


Figura 3. Resultados de las pruebas de patogenicidad en frutos y hojas de mango variedad Keitt siete días después de la inoculación, sobre heridas (parte inferior del fruto, hoja derecha) y sobre tejido sano (parte superior del fruto, hoja izquierda). A, control negativo inoculado con agua estéril; B, MXJAL-463; C, MXJAL-470; D, MXJAL-478; E, MXJAL-484, F, MXJAL-493. Los cuadros en el fondo gris son de 1 cm².

Cuadro 6. Resultados de las pruebas de patogenicidad en hojas y frutos de mango (n° síntomas/n° inoculaciones) con y sin herida, utilizando nueve aislados de *Colletotrichum siamense*, y un aislado de *C. asianum*.

CEPAS	Especie	HOJAS		FRUTOS	
		Con herida	Sin Herida	Con herida	Sin herida
MXJAL-448	<i>C. siamense</i>	18/18	16/18	8/8	5/8
MXJAL-450	<i>C. siamense</i>	18/18	18/18	8/8	7/8
MXJAL-455	<i>C. siamense</i>	18/18	18/18	8/8	8/8
MXJAL-457	<i>C. siamense</i>	18/18	16/18	8/8	8/8
MXJAL-463	<i>C. siamense</i>	18/18	18/18	6/8	8/8
MXJAL-467	<i>C. siamense</i>	18/18	15/18	4/8	4/8
MXJAL-468	<i>C. siamense</i>	18/18	18/18	6/8	6/8
MXJAL-470	<i>C. siamense</i>	18/18	18/18	6/8	8/8
MXJAL-475	<i>C. siamense</i>	18/18	17/18	4/8	0/8
MXJAL-478	<i>C. siamense</i>	18/18	14/18	7/8	0/8
MXJAL-484	<i>C. siamense</i>	18/18	18/18	8/8	6/8
MXJAL-488	<i>C. siamense</i>	18/18	15/18	5/8	2/8
MXJAL-493	<i>C. asianum</i>	18/18	18/18	8/8	7/8
MXJAL-498	<i>C. siamense</i>	18/18	17/18	7/8	4/8

Se diferenciaron 3 tipos de síntomas: a) Lesión necrótica singular entre 0.3-2 cm de diámetro, típica observada en campo en la zona de lesión, en algunos casos se observa crecimiento de micelio y/o estructuras de reproducción (Fig.4A); b) Varias lesiones necróticas pequeñas como puntos necróticos pequeños, también observadas en antracnosis en campo, agrupadas en la zona de inoculación, en algunos casos con escaso micelio o cubiertos por micelio algodonoso (Fig. 4B); c) Sin lesión necrótica, sólo una mata micelial en la zona de inoculación de 0.5 cm de diámetro (Fig. 4C).

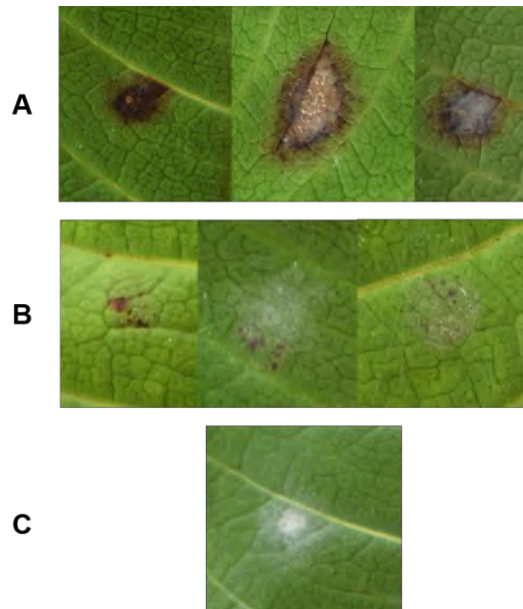


Figura 4. Diferentes síntomas encontrados en las hojas y frutos de mango inoculadas con *Colletotrichum*. Tipo A, lesión necrótica singular, puede tener micelio y/o estructuras de reproducción. Tipo B, varias lesiones necróticas pequeñas, a veces con escaso micelio o cubiertos por micelio algodonoso. Tipo C, sin lesión necrótica, solo una mata micelial en la zona de inoculación.

7.5.3. Pruebas en hojas de mango Keitt. Todos los aislados que se inocularon en las hojas con heridas generaron síntomas del tipo A, mientras que, cuando se inocularon en las hojas sin heridas, se observó mayor variación de síntomas, incluso en diferentes inoculaciones del mismo aislado. Cuatro aislados presentaron síntomas tipo A, 12 presentaron síntomas tipo B, uno síntomas tipo C. Por otro lado, 28 aislados presentaron síntomas de tipo A y B; 10 síntomas de tipo A y C; por último, nueve presentaron síntomas de todos los tipos en las tres hojas.

7.6. Análisis de secuencias repetidas simples internas.

Se comprobó la reproducibilidad de los cinco oligonucleótidos ISSR al obtener el mismo patrón de bandas en ocho aislados de *C. siamense* (MXJAL-436, MXJAL-440, MXJAL-448, MXJAL-450, MXJAL-458, MXJAL-460, MXJAL-473, MXJAL-488) en dos amplificaciones diferentes. En la Figura 5 se presentan los patrones de bandas para los ocho aislados.

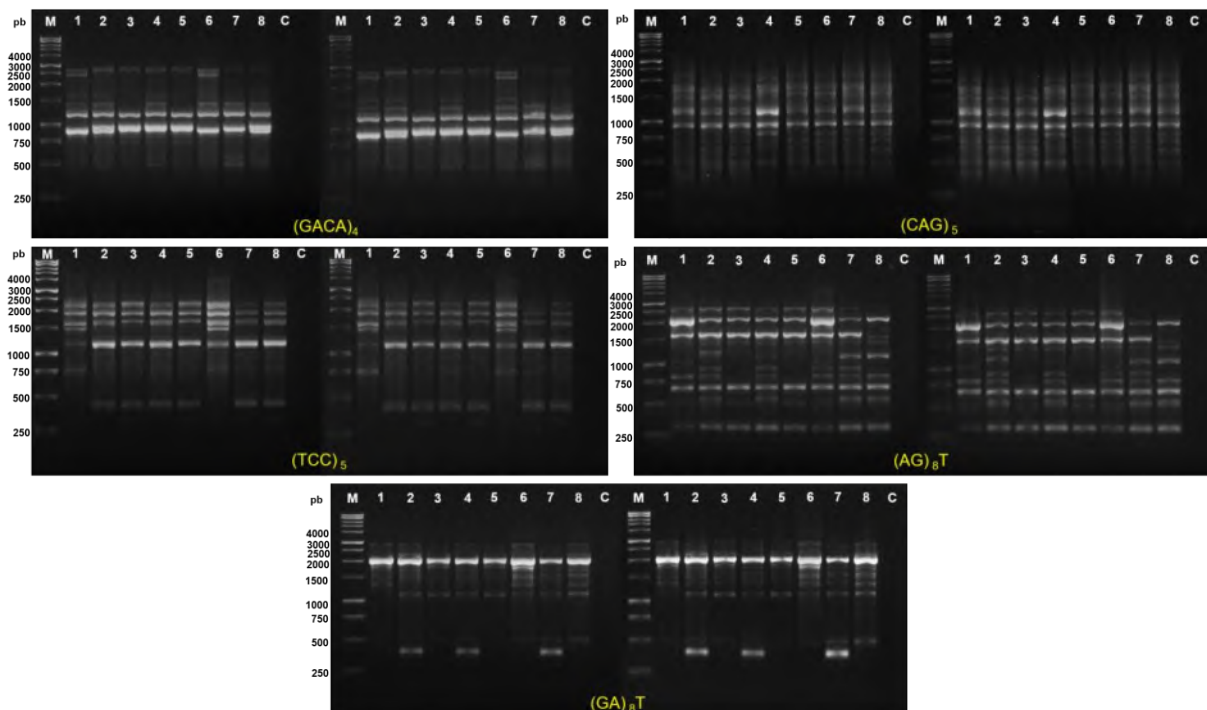


Figura 5. Comparación de dos repeticiones con los cinco oligonucleótidos ISSR (amarillo), utilizando los ocho aislados probados. M, marcador molecular Promega 1kb; 1, MXJAL-436; 2, MXJAL-440; 3, MXJAL-448; 4, MXJAL-450; 5, MXJAL-458; 6, MXJAL-460; 7, MXJAL-473; 8, MXJAL-488; C, control negativo.

Al probar los cinco oligonucleótidos con los 62 aislados de *C. siamense* se encontraron 22 patrones diferentes con el oligonucleótido (GACA)₄ (Fig. 6A), 14 patrones con el (CAG)₅ (Fig. 6B), 16 patrones con el (TCC)₅ (Fig. 6C), 20 patrones diferentes con el (AG)₈T (Fig. 6D) y 22 con el oligonucleótido (GA)₈T (Fig. 6E).

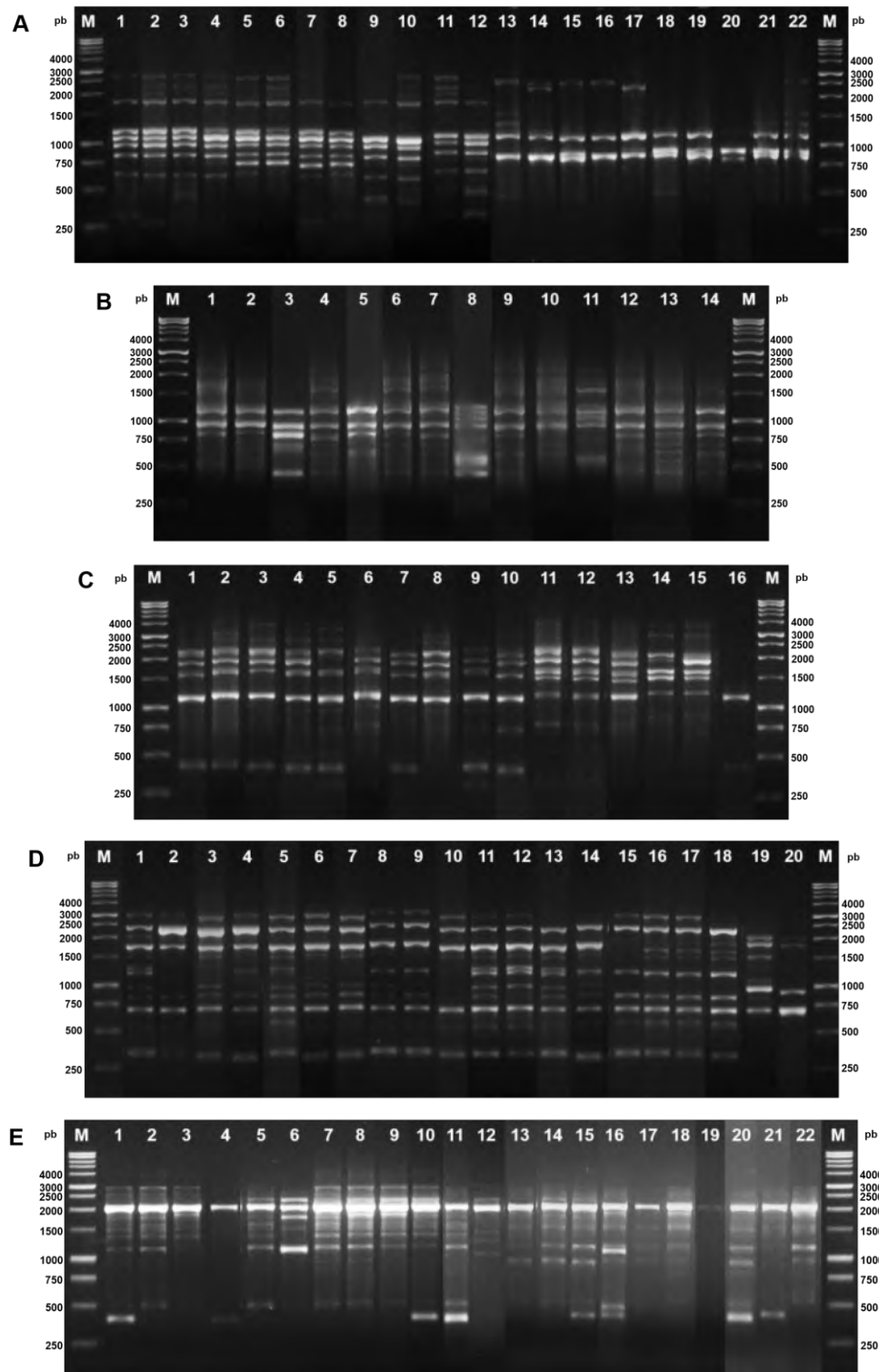


Figura 6. Diferentes patrones de bandeo detectados entre los aislados de *C. siamense* para cada uno de los cinco oligonucleótidos ISSR. Cada gel representa los polimorfismos encontrados por cada oligonucleótido. A, $(GACA)_4$; B, $(CAG)_5$; C, $(TCC)_5$; D, $(AG)_8T$; E, $(GA)_8T$; M, marcador molecular 1kb (Promega).

7.7. Análisis de datos de los ISSRs y diversidad genética.

Los cinco oligonucleótidos probados produjeron un total de 93 bandas de ADN. En total, se detectaron 59 genotipos multilocus diferentes entre los 62 aislados de *C. siamense* analizados. El mayor número de aislados se recuperó de la huerta de Jaluco2 en el municipio de Cihuatlán, lo que se ve reflejado en el mayor número de genotipos detectados (24). Las otras huertas presentaron desde 6 hasta 17 genotipos (Cuadro 7). Los 59 MLG totales presentaron un 58.87% de loci polimórficos y una heterocigosidad esperada de 0.319. La huerta de Jaluco2 mostró la mayor variabilidad con un porcentaje de polimorfismos de 84.95% y una heterocigosidad de 0.305. La huerta de Cascabeles presentó un menor nivel de variabilidad con 33.33% de polimorfismos y 0.185 de heterocigosidad (Cuadro 7). Los resultados del análisis para determinar cómo se heredan los alelos, reflejó que la herencia por bloques es la predominante, debido a que la hipótesis nula fue rechazada ($\lambda = 3.5857$, $p.\lambda = 0.001$, $rbarD = 0.0467$, $p.rD = 0.001$).

Cuadro 7. Análisis de diversidad genética de aislados de *Colletotrichum siamense* obtenidos de frutos de mango con síntomas de antracnosis, en cuatro huertas de dos municipios del estado de Jalisco.

Población	N ^a	%P ^b	MLG ^c	H ^d	L ^e	Hexp ^f	rbarD (p) ^g
Jaluco1	18	59.14%	17	2.81	0.938	0.242	0.0837 (0.001**)
Jaluco2	26	84.95%	24	3.15	0.956	0.305	0.0684 (0.001**)
Cascabeles	6	33.33%	6	1.79	0.833	0.185	0.1448 (0.001**)
AguaCaliente	12	58.06%	12	2.48	0.917	0.216	0.1016 (0.001**)
Total	62	58.87%	59	4.06	0.982	0.319	0.0487 (0.001**)

^aNúmero de aislados

^bPorcentaje de Loci Polimórficos

^cGenotipos Multilocus

^dÍndice de Shannon-Wiener

^eÍndice de Simpson

^fHeterocigosidad esperada

^gÍndice de asociación estandarizado

El análisis AMOVA indicó que la variación entre los municipios constituyó el 28% de la variación genética total, mientras que la variación dentro de las poblaciones muestreadas representó el 66.5% de la variación genética total (Cuadro 8), con un PhiST de 0.3353, lo que indica que hay mayor diversidad genética dentro

de cada huerta, ya que, las huertas que se encuentran en el mismo municipio están más cercanas entre ellas resultando en variantes genéticas que se comparten. Cabe destacar que la distancia geográfica no está relacionada con la distancia genética entre las poblaciones, ya que no se pudo rechazar la hipótesis nula en la prueba de Mantel ($p=0.121$).

Cuadro 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para poblaciones de *Colletotrichum siamense* recuperadas de frutos de mango con síntomas de antracnosis, en cuatro huertas de dos municipios del estado de Jalisco.

Componentes de la variación	GI	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Variación estándar	Porcentaje de Variación
Entre regiones	1	137.98126	137.98126	4.5545777	28.503432
Entre muestras dentro de regiones	2	44.75019	22.3751	0.8030458	5.025617
Dentro de las muestras	58	616.04274	10.62143	10.6214265	66.470951
Total	61	798.77419	13.09466	15.97905	100

La configuración de la red de mínima extensión muestra una relación MLG en forma de árbol, donde se puede diferenciar una rama grande compuesta principalmente por MLGs de Jaluco1 y Jaluco2, así como una rama secundaria, compuesta principalmente por genotipos de Cascabeles y Agua Caliente, por ser las huertas que se encuentran en el mismo municipio. Por último, en el centro y dos ramas terciarias se encuentra una mezcla de genotipos de los 4 sitios (Fig.7).

El análisis bayesiano de agrupamiento no jerárquico identificó a dos grupos genéticos como más probables entre los datos (valor $\Delta K = 14.645235$). Para visualizar la proporción de genotipos por cada población (huerta muestreada), se seleccionó una de las 10 corridas independientes que apoyaron a 2 grupos de acuerdo a su valor LnP más bajo (-1991.7) (Fig. 8). Los resultados mostraron que los grupos se distinguen principalmente por regiones geográficas; en las huertas que se encuentran en el mismo municipio presentan grupos genéticos similares, tal es el caso de Jaluco1 y Jaluco2, donde predomina el grupo 1, mientras que en Cascabeles y Agua Caliente predomina el grupo 2. Jaluco2 es la población que

exhibe mayor mezcla genética y, por otro lado, Cascabeles es la población más pura genéticamente.

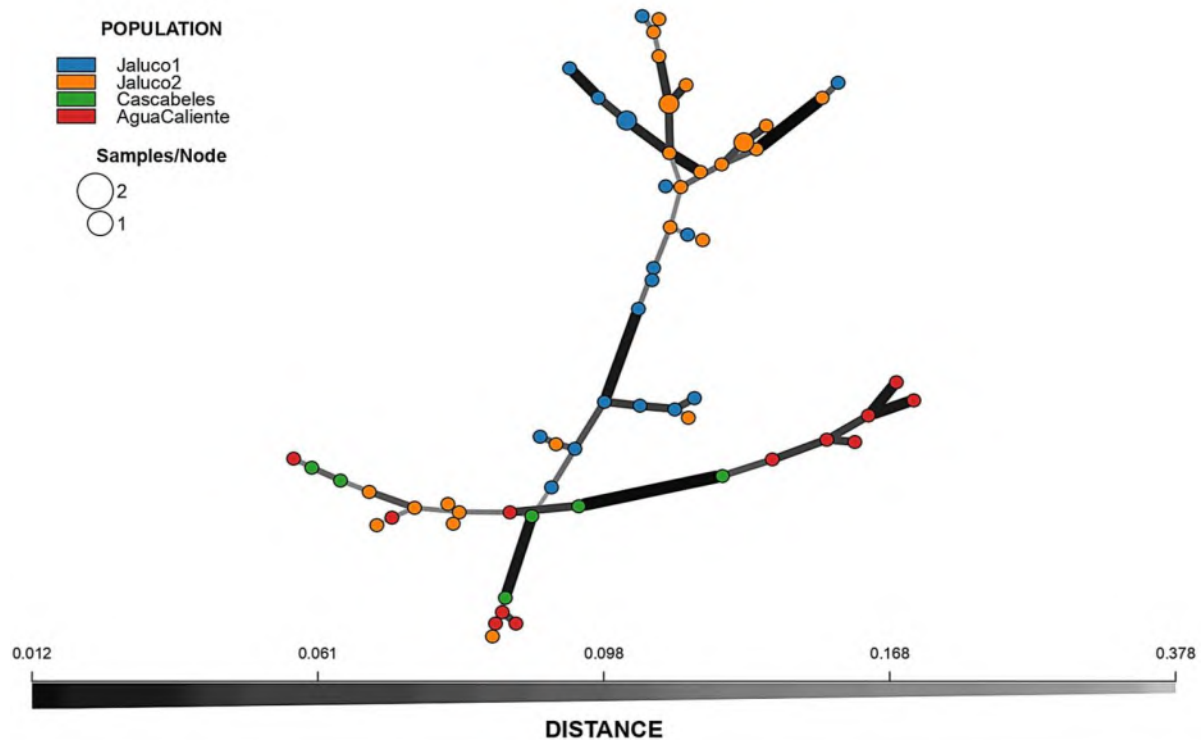


Figura 7. Red de mínima extensión para 59 MLGs obtenidos de 62 aislados de *C. siamense*. Cada círculo corresponde a un MLG y el tamaño del círculo indica la cantidad de aislados de ese genotipo. Los colores simbolizan la huerta a la que pertenecen los genotipos. El grosor y sombra de las ramas representan la disimilitud relativa entre los MLGs.



Figura 8. Proporciones de los dos grupos genéticos más probables obtenidos con el análisis bayesiano de agrupamiento no jerárquico para cada huerta muestreada, colocados en su posición geográfica aproximada. Azul, MLGs pertenecientes al grupo 1; Naranja, MLGs pertenecientes al grupo 2.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se aisló e identificó por primera vez a *Colletotrichum asianum* y *C. siamense* como agentes causales de antracnosis en frutos de mango de precosecha en el estado de Jalisco. La identificación multilocus permitió detectar a las dos especies de *Colletotrichum*, mientras que, al completar exitosamente los postulados de Koch, se confirmó que estas especies son responsables del incremento de la antracnosis en precosecha en huertas comerciales de dos municipios del estado de Jalisco.

Se probó la patogenicidad de los 64 aislados de *Colletotrichum*, 62 de *C. siamense* y dos de *C. asianum*, ya que indujeron síntomas de antracnosis en hojas de mango var. Keitt. Catorce de los aislados también fueron patogénicos en frutos de la misma variedad. Los resultados de las inoculaciones en frutos Keitt confirmaron lo reportado por Flores Mendez (2022), quien demostró previamente la patogenicidad de cuatro de los 14 aislados inoculados en este trabajo. Adicionalmente, en el trabajo antes mencionado, se demostró la patogenicidad de dos aislados (MXJAL-463 y MXJAL-484) en frutos de mango var. Paraiso.

La enfermedad de antracnosis en mango ya había sido reportada anteriormente en hojas y frutos de ocho estados productores en México, causada por siete especies de *Colletotrichum*. La especie de *C. asianum* se reportó en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Sinaloa y Veracruz (Honger *et al.*, 2014; Tovar-Pedraza *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020), mientras que *C. siamense* se reportó en los mismos estados antes mencionados, pero también en Oaxaca (Tovar-Pedraza *et al.*, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020). No obstante, hasta la fecha no se habían hecho estudios sobre esta enfermedad en el estado de Jalisco, el cual se encuentra entre los 10 principales productores del país. Aunado a lo encontrado por Tovar-Pedraza *et al.* (2019), donde en seis de los ocho estados estudiados, *C. siamense* es el predominante entre los aislados, de igual manera se observó entre nuestros aislados el elevado número de aislados pertenecientes a esta especie (62) en comparación con *C. asianum* (2).

Los estudios en los que se ha analizado la diversidad genética en poblaciones de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en mango son escasos.

Sornakili *et al.* (2017) realizaron una comparación entre los marcadores ISSR y RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico) para la evaluación de polimorfismos genéticos en aislados de *C. gloeosporioides* de mango; ellos reportan que a pesar que ambas técnicas son eficientes y reproducibles, los ISSRs revelan mayor variabilidad genética. No obstante, Sharma *et al.* (2019) obtuvieron mayores polimorfismos con marcadores RAPD que con ISSRs, en poblaciones de *C. lindemuthianum* aislado de antracnosis en frijol. Estos resultados demuestran que el grado de diversidad detectada no depende de la técnica utilizada sino del grupo de estudio analizado. En este trabajo se seleccionaron cinco de los primers ISSR que presentaron los mayores valores de porcentajes de polimorfismos y el contenido de información polimórfica en el trabajo de Sornakili *et al.* (2017).

El análisis de los ISSRs reveló que entre los 62 aislados de *C. siamense* se detectó un total de 59 genotipos diferentes provenientes de cuatro huertas de dos municipios de Jalisco. Este es un número alto en comparación con un estudio con 132 aislados de *C. gloeosporioides* en papaya provenientes de cinco regiones, que presentaron 36 MLGs (Rampersad, 2013). No obstante, a pesar de que son 59 los MLGs, el porcentaje de polimorfismo (%P) es 58.87%, lo cual contrasta con los 35 MLGs y 83 %P de 58 aislados de *C. gloeosporioides* de cítricos detectados por Bahri *et al.*, (2019). Además, se observó una relación directamente proporcional entre el número de aislados y el número de genotipos multilocus, similar a lo observado en *C. truncatum* aislado de varias legumbres (Sharma, 2009) y *C. gloeosporioides* de diferentes cítricos (Bahri *et al.*, 2018), en donde los sitios con mayor número de aislados también tienen un mayor número de MLGs y viceversa.

La heterocigocidad esperada osciló entre 0.185 y 0.305, mientras que el %P varió entre 33.33% y 84.95%. En comparación, cuatro poblaciones de *C. gloeosporioides* aislados de cítricos también presentaron valores elevados de diversidad genética que oscilan entre 0.209 y 0.403, pero los porcentajes de polimorfismos son más altos, desde 60.87% hasta 100% (Moges *et al.*, 2016).

Los resultados del análisis del desequilibrio de ligamiento mostraron que predomina la reproducción clonal en las poblaciones; sin embargo, la recombinación sexual no es el único factor por el cual se introduce variabilidad en una población;

mecanismos como las mutaciones, el flujo de genes, además, de la deriva génica y selección también generan diversidad genética entre organismos patógenos (Agrios, 2005).

Se observó diferenciación genética entre las huertas que pertenecían a diferentes municipios, la variación total se divide principalmente en dos grupos, de los cuales, en el municipio de La Huerta predomina el grupo 1, mientras que en Cihuatlán es el grupo 2. Asimismo, la red de mínima expansión refleja que la mayor cantidad de MLGs se encuentran repartidas principalmente entre las huertas del municipio de Cihuatlán. Estas diferencias genéticas observadas entre las poblaciones se pueden deber a factores como barreras geográficas, la selección y adaptación a condiciones locales y/o expansiones clonales (Li *et al.* 2016).

A pesar de estas observaciones el análisis de AMOVA identificó el mayor porcentaje de variación dentro de las poblaciones y no entre ellas, que puede ser el resultado de eventos que convergen entre poblaciones, dando variantes genéticas semejantes entre sí.

El análisis de más aislados en otros municipios y la caracterización de aislados recuperados en postcosecha puede ayudar a esclarecer el espectro de la variación genética que pueden presentar estas especies y su relación con el aumento en la severidad de esta enfermedad en precosecha.

9. CONCLUSIONES

Se confirma que dos especies de *Colletotrichum* (*C. asianum* y *C. siamense*) son los agentes causales de la antracnosis en dos huertas de mango en el estado de Jalisco al reproducir exitosamente los síntomas de antracnosis en el tejido inoculado en el laboratorio.

Los análisis ISSR indicaron alta diversidad genética dentro de las poblaciones en términos del porcentaje de polimorfismos, heterocigosidad esperada y los índices de variación.

La huerta de Jaluco2 mostró mayor diversidad genética en términos del %P = 84.95% y $H_{exp} = 0.305$, a diferencia de la huerta Cascabeles con los menores valores de %P = 33.33% y $H_{exp} = 0.185$.

Se determinó que predomina la herencia por bloques y la variación se puede congregar en dos grupos genéticos.

10. REFERENCIAS

- Agapow, P. M. y A. Burt. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1: 101-102.
- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Quinta edición. Elsevier. 922 pp.
- Anwar, S. A., M. V. McKenry, y H. A. Ahmad. (2012). Nematode and fungal communities associated with mango decline of southern Punjab. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(4): 915-922.
- Arauz, L. F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease*, 84(6), 600-611.
- Bahri, B. A., M. Saadani, G. Mechichi y W. Rouissi. (2019). Genetic diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex associated with citrus wither-tip of twigs in Tunisia using microsatellite markers. *Journal of Phytopathology*, 167(6): 351-362.
- Benítez-Camilo, F. A., G. Huerta-Palacios, F. Holguín-Meléndez, y J. Toledo-Arreola. (2003). Efecto de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en la caída de frutos de mango cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21: 223-227.
- Bonfield, J. K. y A. Whitwham. (2010). Gap5 - editing the billion fragments sequence assembly. *Bioinformatics*, 26: 1699-1703.
- Cannon, P. F., U. Damm, P. R. Johnston, B. S. Weir. (2012). *Colletotrichum*—current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73: 181-213.
- Carbú, M., J. Moraga, J. M. Cantoral, I. G. Collado y C. Garrido. (2020). Recent approaches on the genomic analysis of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum* spp. *Phytochemistry Reviews*, 19: 589-601.
- Corda, A. C. I. (1831). Die Pilze Deutschlands (ed. J. Sturm). Deutschlands Flora, 3. Abtheilung 3: 1-144.
- dos Santos-Vieira, W. A., P., Alves-Bezerra, A. C. da Silva, J., Silva-Veloso, M. P., Saraiva-Câmara, y V. P. Doyle. (2020). Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 143: 106694.

- Earl, D. A., y B. M. VonHoldt. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 359-361.
- Edler, D., J. Klein, A. Antonelli, y D. Silvestro. (2020). raxmlGUI 2.0: a graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution*, 12(2): 373-377.
- Evanno, G., S. Regnaut, y J. Goudet. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- FAO, FAOSTAT. (2020). Clasificaciones. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity (01 de marzo de 2022).
- FAO. (2020). Análisis del mercado de las principales frutas tropicales de 2019. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura. Roma.
- Flores-Méndez, G. (2022). Patogenicidad, virulencia y sensibilidad a productos biológicos, de aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de mango con antracnosis. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH.
- Fuentes-Aragón, D., V. Guarnaccia, A. Rebollar-Alviter, S. B. Juárez-Vázquez, F. Aguirre-Rayó y H. V. Silva-Rojas. (2020). Multilocus identification and thiophanate-methyl sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* species complex associated with symptomatic fruit and asymptomatic leaves of mango. *Plant Pathology*, 69(6): 1125-1138.
- Guerber, J. C., B. Liu, J. C. Correll, y P. R. Johnston. (2003). Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95(5): 872-895.
- Gutiérrez-Alonso, J. G., D. Nieto-Ángel, D. Téliz-Ortiz, E. Zavaleta-Mejía, H. Vaquera-Huerta, T. Martínez-Damián y F. Delgadillo-Sánchez. (2001).
-

- Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19: 90-93.
- Haggag, W. M. (2010). Mango diseases in Egypt. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3): 285-289.
- Honger, J. O., S. K. Offei, K. A. Oduro, G. T. Odamtten y S. T. Nyaku. (2014). Identification and species status of the mango biotype of *Colletotrichum gloeosporioides* in Ghana. *European Journal of Plant Pathology*, 140: 455-467.
- Ismail, A. M., G., Cirvilleri, T., Yaseen, F., Epifani, G., Perrone, y G. Polizzi. (2015) Characterisation of *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of mango in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 97: 167-171.
- Kamvar, Z. N., J. F. Tabima, y N. J. Grünwald. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2: e281.
- Kumar, N., T. Jhang, y T. R. Sharma. (2011). Molecular and pathological characterization of *Colletotrichum falcatum* infecting subtropical Indian sugarcane. *Journal of Phytopathology*, 159(4): 260-267.
- Leslie, J. F. y Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. U.S.A-Oxford-Australia. 388 pp.
- Li, H., G. Y. Zhou, J. A. Liu y J. Xu. (2016). Population genetic analyses of the fungal pathogen *Colletotrichum fructicola* on tea-oil trees in China. *PloS one*, 11(6): e0156841.
- Li, Q., J. Bu, J. Shu, Z. Yu, L. Tanh, S. Huang, T. Guo, J. Mo, S. Luo, G. S. Solangi, y T. Hsiang. (2019). *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. *Scientific Reports*, 9: 18891
- Mantel, N. A. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Manzano-León, A. M., W. Serra-Hernández, L. García-Pérez, K. Crespo, y V. Guarnaccia. (2018). First report of leaf anthracnose caused by *Colletotrichum*

-
- grossum* on mango (*Mangifera indica*) in Cuba. *Journal of Plant Pathology*, 100(2): 329.
- Marasas, W. F. O., R. C. Ploetz, M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, y E. T. Steenkamp. (2006). Mango malformation disease and the associated *Fusarium* species. *Phytopathology*, 96(6): 667-672.
- Marin-Felix, Y., J. Z. Groenewald, L. Cai, Q. Chen, S. Marincowitz, I. Barnes, K. Bensch, U. Braun, E. Camporesi, U. Damm, Z. W. de Beer, A. Dissanayake, J. Edwards, A. Giraldo, M. Hernandez-Restrepo, K. D. Hyde, R. S. Jayawardena, L. Lombard, J. Luangsa-ard, A. R. McTaggart, A. Y. Rossman, M. Sandoval-Denis, M. Shen, R. G. Shivas, Y. P. Tan, E. J. van der Linde, M. J. Wingfield, A. R. Wood, J. Q. Zhang, Y. Zhang y Crous. (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology*, 86: 99-216.
- Mo, J., G. Zhao, Q. Li, G. S. Solangi, L. Tang, T. Guo, S. Huang y T. Hsiang. (2018). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China. *Plant Disease*, 102(7): 1283-1289.
- Moges, A. D., B. Admassu, D. Belew, M. Yesuf, J. Njuguna, M. Kyalo y S. R. Ghimire. (2016). Development of microsatellite markers and analysis of genetic diversity and population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. *PloS one*, 11(3), e0151257.
- Montero-Tavera, V., J. L. Morales García, M. M. González Chavira, J. L. Anaya López, T. Corona Torres y A. Gálvez Mariscal. (2010). Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(2): 159-174.
- Mukherjee, S. K. y R. E. Litz. (2009). The mango: Botany production and uses. Second edition. CAB international, Wallingford, UK. 680 p.
- Otero-Colina, G., G. Rodríguez-Alvarado, S. Fernández-Pavía, M. Maymon, R. C. Ploetz, y T. Aoki. (2010). Identification and characterization of a novel etiological agent of mango malformation disease in Mexico, *Fusarium mexicanum* sp. nov. *Phytopathology*, 100(11): 1176-1184.
-

- Pardo-de la Hoz, C. J., C. Calderón, A. M. Rincón, M. Cárdenas, G. Danies, L. López-Kleine, S. Restrepo, y P. Jiménez. (2016). Species from the *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum boninense* and *Colletotrichum gloeosporioides* species complexes associated with tree tomato and mango crops in Colombia. *Plant Pathology*, 65: 227-237.
- Patel, P., B. K. Rajkumar, P. Parmar, R. Shah, y R. Krishnamurthy. (2018). Assessment of genetic diversity in *Colletotrichum falcatum* Went accessions based on RAPD and ISSR markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1): 153-159.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pérez-Brito, D., A. Cortes-Velázquez, T. Valencia-Yah, A. Magaña-Álvarez, C. Navarro, B. Moreno, S. Quiroga, R. Tapia-Tussell. (2018). Genetic variation of *Colletotrichum magnum* isolated from *Carica papaya* as revealed by DNA fingerprinting. *Journal of Microbiology*, 56(11): 813-821.
- Ploetz, R. C. (2003). Diseases of Mango. pp. 327-363. En: R. C. Ploetz (ed.) *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Ploetz, R. C. 2009. Antracnosis en mango: Manejo de la enfermedad más importante en pre y postcosecha. Universidad de la Florida, USA. TREC-Homestead Departamento de Fitopatología. 11p.
- Ploetz, R. C., y S. Freeman. (2009). Foliar, floral and soilborne diseases. pp. 231-302. En: Litz, R. E. (ed). *The Mango*. CABI, Wallingford, UK.
- Pritchard, J. K., M. Stephens y P. Donnelly. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959.
- Rambaut, A., A. J. Drummond, D. Xie, G. Baele, y M. A. Suchard. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5): 901-904.
- Rampersad, S. N. (2013). Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. *Phytopathology*, 103(2): 182-189.

- Rojas-Martínez, R. I., E. Zavaleta-Mejía, D. Nieto-Ángel y M. Acosta-Ramos. (2008). Virulence and genetic variation of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. And Sacc. on mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. *Revista Mexicana Fitopatología*, 26: 21-26.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. Van Der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, y J. P. Huelsenbeck. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3): 539-542.
- Sharma, N., N. Kumari, S. K. Sharma, B. A. Padder, y P. N. Sharma. (2019). Investigating the virulence and genetic diversity of *Colletotrichum lindemuthianum* populations distributed in the North Western Himalayan hill states. *Journal of Plant Pathology*, 101(3): 677-688.
- Sharma, R. (2009). Genetic differentiation of host limited forms of *Colletotrichum truncatum* from northwestern Himalayas. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(10): 960-966.
- Shivas, R. G., Y. P. Tan, J. Edwards, Q. Dinh, A. Maxwell, V. Andjic, J. R. Liberato, C. Anderson, D. R. Beasley, K. Bransgrove, L. M. Coates, K. Cowan, R. Daniel, J. R. Dean, M. F. Lomavatu, D. Mercado-Escueta, R. W. Mitchell, R. Thangavel, L. T. T. Tran-Nguyen, y B. S. Weir. (2016). *Colletotrichum* species in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 45(5): 447-464.
- SIAP. (2020). Avance de siembras y cosechas. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/ (01 de marzo de 2022).
- Sornakili, A., P. K. Rathinam, R. Thiruvengadam, y P. Kuppasamy. (2017). Comparative assessment of RAPD and ISSR markers to study genetic polymorphism in *Colletotrichum gloeosporioides* isolates of mango. *Asian Journal of Plant Pathology*, 11: 130-138.
- Tarnowski, T. L. B. y R. Ploetz. (2008). Assessing the role of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* in mango anthracnose in south Florida. *Phytopathology*, 98: 155-159.

- Tovar-Pedraza, J. M., J. A. Mora-Aguilera, C. Nava-Díaz, N. B. Lima, S. J. Michereff, J. S. Sandoval-Islas, M. P. S. Câmara, D. Téliz-Ortiz, S. G. Leyva-Mir. (2019). Distribution and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Mexico. *Plant Disease*, 104(1): 137-146.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, y J. W. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. En: Innis, M.A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York, NY, USA.
- Willis K. J. y S. Bachman. (2016). State of the world's plants 2016. Report. Royal Botanic Gardens Kew, London.
- Zombré, C., P. Sankara, S. L. Ouédraogo, I. Wonni, O. Pruvost, C. Boyer, C. Vernière, A. Adandonon, J. F. Vayssières, y B. C. Ahohuendo. (2015). First report of *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica* L. in Benin. *Plant Disease*, 99(12): 1854-1854.

11. ANEXOS

11.1. Análisis filogenéticos

11.1.1. Crear archivos de secuencias. A continuación, se muestra el script con los comandos para descargar las secuencias del NCBI en formato fasta (se debe de contar con los números de accesión que se desean utilizar para cada gen, incluyendo el grupo externo). El texto después de un # no se toma como comando, sirve para hacer notas. Se debe de contar con la versión más reciente de R (<https://www.r-project.org/>), el script también puede ser utilizado en RStudio (<https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/>), no obstante, este es un entorno de desarrollo integrado para el lenguaje de programación R, por lo que se necesita tener R instalado para usarlo.

```
#Instalar paquetes (instalar solo una vez, posteriormente solo cargar los
paquetes).
install.packages("ape")
install.packages("seqinr")
#Cargar paquetes
library(ape)
library("seqinr")
#Establecer directorio de trabajo (donde se guardan los documentos
creados)
setwd("C:\\Users\\Usuario\\Documents\\Ejemplo")

#Crear objeto con los números de accesión (antes del símbolo "<-"  
del objeto, solo incluir las secuencias que son de un mismo gen).
AN_Colleto_ITS <-
c("JX010250","JX010162","JX010245","JX010278","MF039770","MF039771",
",","MF039772","JX010171","KJ955093","JQ894653","MK955387")
AN_Colleto_GPDH <-
c("JX009940","JX010051","JX009942","JX010019","MF040789","MF040790",
",","MF040791","JX009924","KJ954794","JQ894624","MK948843")

#Crear archivos con las secuencias de ITS
Secuencias_ITS<-read.GenBank(AN_Colleto_ITS)
Secuencias_GenBank_ITS <- paste(attr(Secuencias_ITS, "species"), names
(Secuencias_ITS))
write.dna(Secuencias_ITS, file ="Colletotrichum_ITS_AN.txt", format =
"fasta", append =
FALSE, nbc0l = 6, colsep = " ", colw = 10)
```

```

Secuencias_nombre_ITS <- read.fasta(file = "Colletotrichum_ITS_AN.txt",
seqtype = "DNA",
as.string = TRUE, forceDNAtolower = FALSE)
write.fasta(sequences = Secuencias_nombre_ITS, names =
Secuencias_GenBank_ITS,
nbchar = 10, file.out = "Colletotrichum_ITS_name.txt")

#Crear archivos con las secuencias gpdh (mismos comandos, diferentes
nombres de objetos).
Secuencias_GPDH<-read.GenBank(AN_Colleto_GPDH)
Secuencias_GenBank_GPDH <- paste(attr(Secuencias_GPDH, "species"),
names
(Secuencias_GPDH))
write.dna(Secuencias_GPDH, file ="Colletotrichum_GPDH_AN.txt", format =
"fasta", append =
FALSE, nbcoll = 6, colsep = " ", colw = 10)
Secuencias_nombre_GPDH <- read.fasta(file =
"Colletotrichum_GPDH_AN.txt", seqtype = "DNA",
as.string = TRUE, forceDNAtolower = FALSE)
write.fasta(sequences = Secuencias_nombre_GPDH, names =
Secuencias_GenBank_GPDH,
nbchar = 10, file.out = "Colletotrichum_GPDH_name.txt")

```

Se generan dos documentos en bloc de notas con formato fasta para cada gen, uno con los nombres de las especies y el otro solo con los números de accesión (Fig. 9).

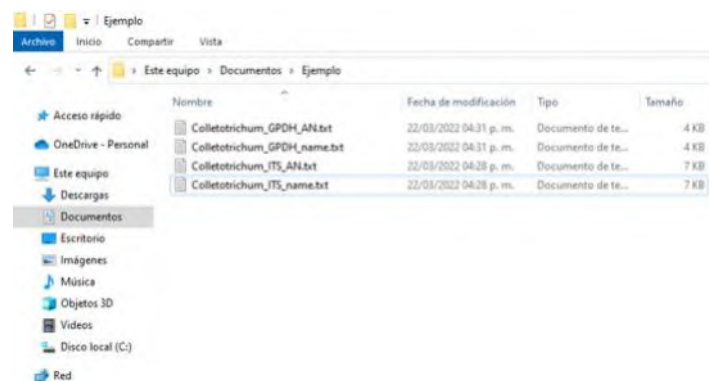


Figura 9. Directorio de trabajo donde se guardan los archivos de las secuencias descargadas del GenBank utilizando R.

Después, abrir documento con los nombres y agregar las secuencias de los aislados del trabajo, además, modificar los nombres, solo el número del código de

los aislados del trabajo y quitar el género, los números de accesión y los guiones de los nombres de las secuencias descargadas (para que los programas no tengan problema con los nombres de las secuencias), si hay más de una secuencia para la misma especie se pueden enumerar o utilizar las letras de los números de accesión. Además, cotejar con el archivo del otro gen para que las secuencias que son del mismo aislado tengan el mismo nombre (para que los programas reconozcan las secuencias que son del mismo aislado), guardar con un nombre diferente (Fig. 10).

Figura 10. Archivos de secuencias de dos genes. A, secuencias de la región ITS; B, secuencias del gen *gpdh*. Cuadros rojos, ejemplo de secuencias de dos aislados de la misma especie con nombres diferentes para el mismo gen, pero iguales entre los archivos de los dos genes. Cuadros azules, ejemplo del nombre con solo el número de los aislados del trabajo.

11.1.2. Alineamiento. Las secuencias se pueden alinear en la página del EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>). Existen diferentes técnicas para realizar el alineamiento dependiendo de las secuencias utilizadas, el más común es Clustal Omega. Sin embargo, las secuencias del gen *gpdh* se alinearon mejor

utilizando MUSCLE, cuyos pasos se describen a continuación: Launch MUSCLE - Step 1: Seleccionar archivo, Step 2: output format=Pearson/FASTA, Step 3: submit (Fig.11) - Download Alignment File - Copiar todas las secuencias - Pegar en un bloc de notas - archivo - guardar como - archivo fasta (“nombre.fasta”) (Fig. 12).

The screenshot shows the EMBL-EBI MUSCLE web interface. The header includes navigation links for EMBL-EBI, Services, Research, Training, Industry, and About us. The main title is 'MUSCLE' with sub-links for 'input form', 'Web services', 'Help & Documentation', and 'Bioinformatics Tools FAQ'. Below the title, it says 'Tools > Multiple Sequence Alignment > MUSCLE'. The main heading is 'Multiple Sequence Alignment' with a brief description: 'MUSCLE stands for Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation. MUSCLE is claimed to achieve both better average accuracy and better speed than ClustalW2 or T-Coffee, depending on the chosen options.' An 'Important note' states: 'This tool can align up to 500 sequences or a maximum file size of 1 MB.' The interface is divided into three steps: 'STEP 1 - Enter your input sequences' with a text area and a file upload button; 'STEP 2 - Set your Parameters' with a dropdown menu for 'OUTPUT FORMAT' set to 'Pearson/FASTA' and a 'More options' link; and 'STEP 3 - Submit your job' with a checkbox for email notifications and a 'submit' button. A footer note reads: 'If you use this service, please consider citing the following publication: The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019'.

Figura 11. Ejemplo de la página de EMBL-EBI para realizar el alineamiento utilizando MUSCLE.

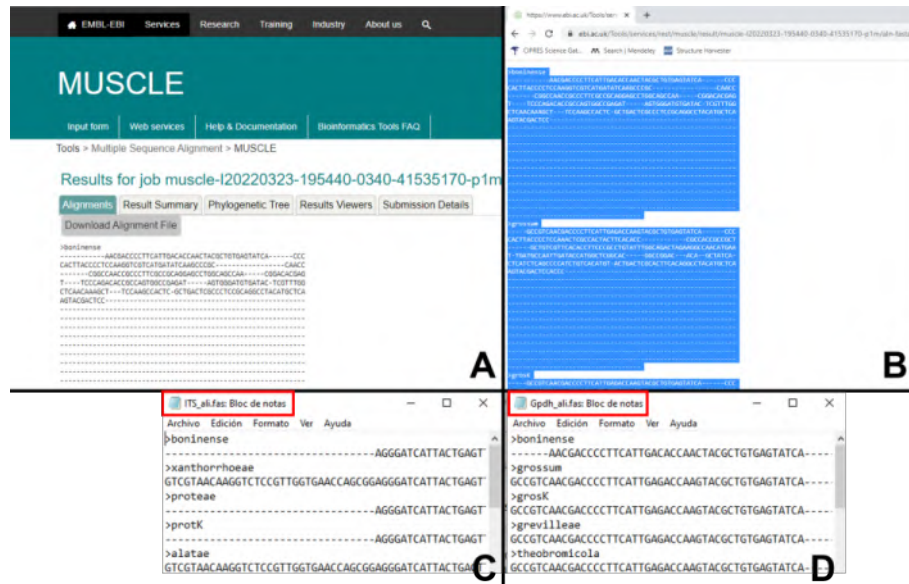


Figura 12. Pasos para descargar el alineamiento y guardar como archivo FASTA. A, resultados del alineamiento; B, alineamiento después de presionar el botón de “Download alignment file”; C, alineamiento de ITS; D, alineamiento de *gpdh*. C y D, Archivos fasta abiertos con bloc de notas.

Después, revisar y/o editar el/los alineamiento(s) con el programa AliView (<https://ormbunkar.se/aliview/>). La región ITS se compone de varios genes, 18S ribosomal, ITS1, 5.8S ribosomal, ITS2, 28S ribosomal, por lo que lo mejor es separarlos en archivos diferentes, principalmente ITS1, 5.8S e ITS2, ya que 18S y 28S son los extremos y no están completos. Buscar una secuencia en el GenBank del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el número de accesión que contenga información de donde se localizan estos genes en la secuencia (Fig. 13).

NCBI Resources | How To | Sign in to NCBI

Nucleotide | Nucleotide | Search

Advanced

COVID-19 Information

Public health information (CDC) | Research information (EMBL) | SARS-CoV-2 data (NCBI) | Prevention and treatment information (WHO) | Leadoff

GenBank | Send to | Change region shown | Customize view

Colletotrichum boninense culture-collection CBS:123755 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank | JQ05193.1

FASTA | Genomes | Eutils

GenInfo

LOCUS JQ05193 554 bp DNA linear GJF 03-JUN-2010

DEFINITION Colletotrichum boninense culture-collection CBS:123755 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JQ05193

VERSION JQ05193.1

KEYWORDS

SOURCE Colletotrichum boninense

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (08-09/2011) CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, Dieren 3804 CT, The Netherlands

FEATURES

source

1..554

organism="Colletotrichum boninense"

mol_type="genomic DNA"

strain="CBS 123755"

host="Citrullus asiaticum var. sinicum"

culture_collection="CBS:123755"

culture_collection="VAFK499D:105972"

type_material="culture from holotype of Colletotrichum boninense"

db_keyof="taxon:JQ05193"

country="Japan"

18S

product="18S ribosomal RNA"

ITS1

product="internal transcribed spacer 1"

5.8S

product="5.8S ribosomal RNA"

ITS2

product="internal transcribed spacer 2"

28S

product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 agpagaatt actgagttac agttatcaca gctttgtga atatactaa actgttgtt

41 tggpaggata ggtgtgtctt tgaagaagaa gctctctggp gggagaggaa ggggggtgg

121 gggggagctt gggggctggc gggagataaa caaagatgat ttaagagcgt ttctctctga

151 ggggttagag caaaactaac aaaaacttca aaaaagagca ttgtgtgtct gttctctgag

241 aagaacagca gaaatagcga taagttaagt gaaatgaga atctatgaga tcatagatc

301 ttgaaagca acttggagcc gaaagatctc ttggggagaa gctgttoga ggttactctc

343 aacatcagc actgtctctg ctgtgtgctt ctacagctga gtagagcctt caaaagatg

421 ggggagcctt ggggagcctt ctgtgtgcta gaaacttctc gttctgactt ggtatctga

451 ggggtctctg ggggagcctt ctgtgtgcta tttaggtctg ctgtctgaga gttgagata

541 tccctgagc tta

Figura 13. Página del NCBI con la secuencia de ITS de la especie *C. boninense*, la cual tiene los nucleótidos que abarca cada gen (resaltado en azul). Línea punteada=hacia abajo en la misma página.

Con esta información, abrir el alineamiento en AliView y localizar la secuencia, a continuación, con la información de la página del NCBI, localizar los genes tomando en cuenta los gaps generados por el alineamiento (ej. ITS1, en la secuencia de *C. boninense* se localiza entre los nucleótidos 12 y 200, mientras que en el alineamiento esta entre 45 y 239) (Fig. 14).



Figura 14. Ubicación de la región ITS1 en la secuencia de *C. boninense* (A) y posteriormente en el alineamiento (B). Línea punteada = hacia la derecha en la misma página. Flechas rojas = comienzo (nucleótido 45) y final (nucleótido 239) de la región ITS1.

Comenzar a eliminar nucleótidos en el extremo 3' (evitar que cambie la numeración del gen), seleccionar el nucleótido donde comienza el siguiente gen o región (ej. ITS1, seleccionar 240), colocar cursor en la barra de números en la línea del número correspondiente (selecciona toda la columna) - Selection - Expand selection right - Edit - Delect selected - Aceptar. Ir al extremo 5', seleccionar el nucleótido donde comienza el gen anterior (ej. ITS1, seleccionar 44) - Selection - Expand selection left - Edit - Delect selected - Aceptar (Fig. 15).

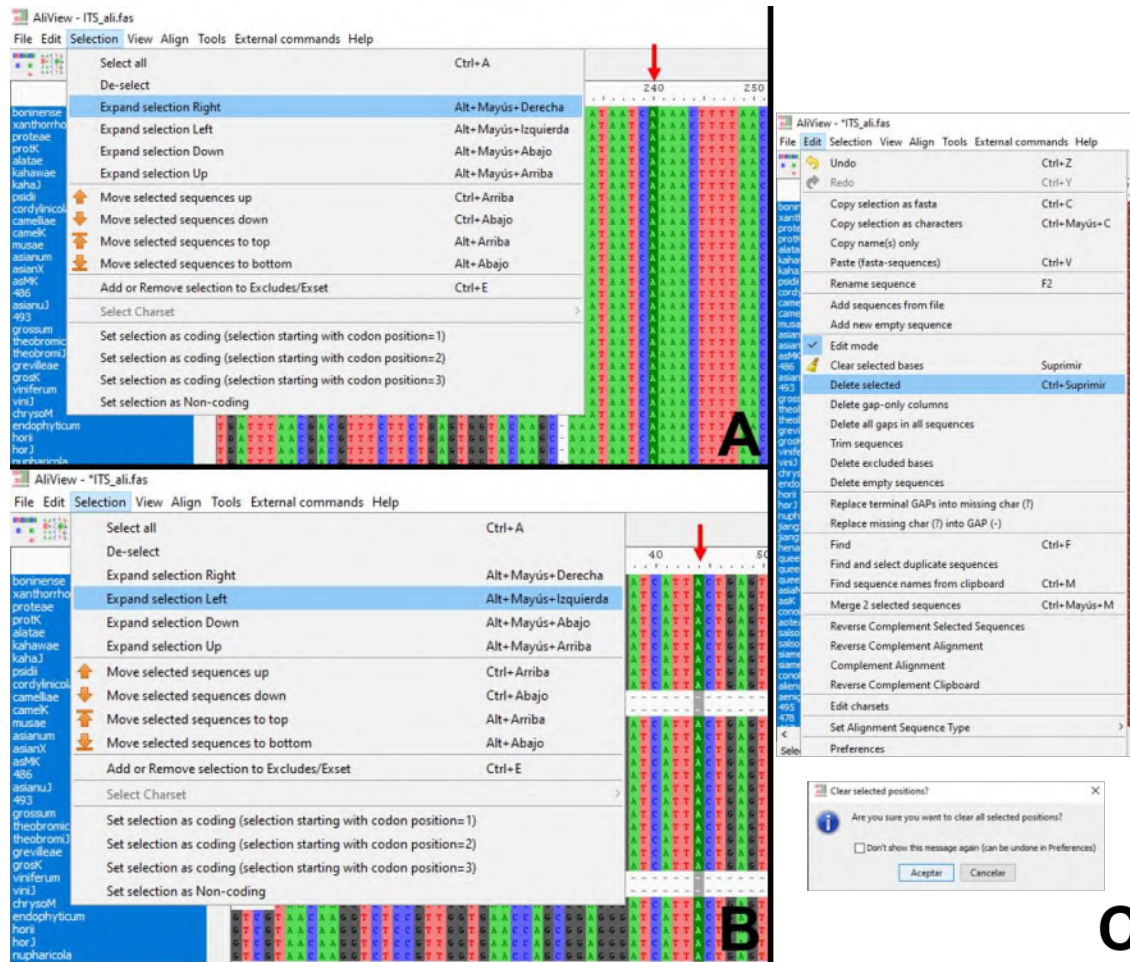


Figura 15. Pasos para editar el alineamiento y obtener las secuencias de la región ITS1. A, seleccionar nucleótidos de la región ITS1 hacia el extremo 3'; B, seleccionar nucleótidos de la región ITS1 hacia el extremo 5'; C, eliminar selección. Flechas rojas = selección excluyendo a la región ITS1 (nucleótidos 240-A y 44-B).

Por último, guardar con el nombre del gen: File - Save as Fasta - Nombre del archivo - Guardar (Fig. 16). Abrir de nuevo el alineamiento de la región ITS completa y realizar el mismo procedimiento con los demás genes.

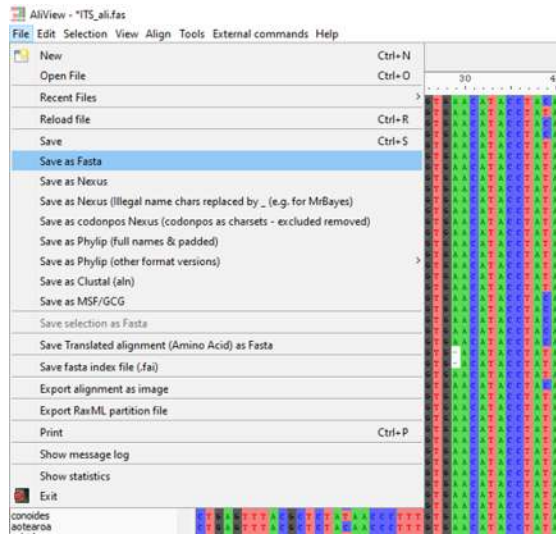


Figura 16. Pasos para guardar el alineamiento nuevo de un solo gen.

11.1.3. Concatenar secuencias. Se utiliza el programa Sequence Matrix (<http://www.ggvaidya.com/taxondna/>) para concatenar los alineamientos en una sola matriz; además, se necesita la versión más reciente de Java para correr este programa (<https://www.oracle.com/java/technologies/java-se-glance.html>). Abrir SequenceMatrix.jar - Import - Add sequences - Seleccionar alineamiento - Abrir - “Would you like to recode external gaps as question marks?”: No to all - Repetir para el resto de los genes. Otro método, seleccionar todos los alineamientos - arrastrar hacia la ventana de Sequence Matrix (Fig. 17). Revisar que todos los aislados tengan los genes empleados (columna: No of charsets), en caso de que las secuencias de un mismo aislado difieran en el nombre estas se pondrán por separado, por lo que es necesario editar el nombre en el alineamiento y volver a cargar los archivos en Sequence Matrix.

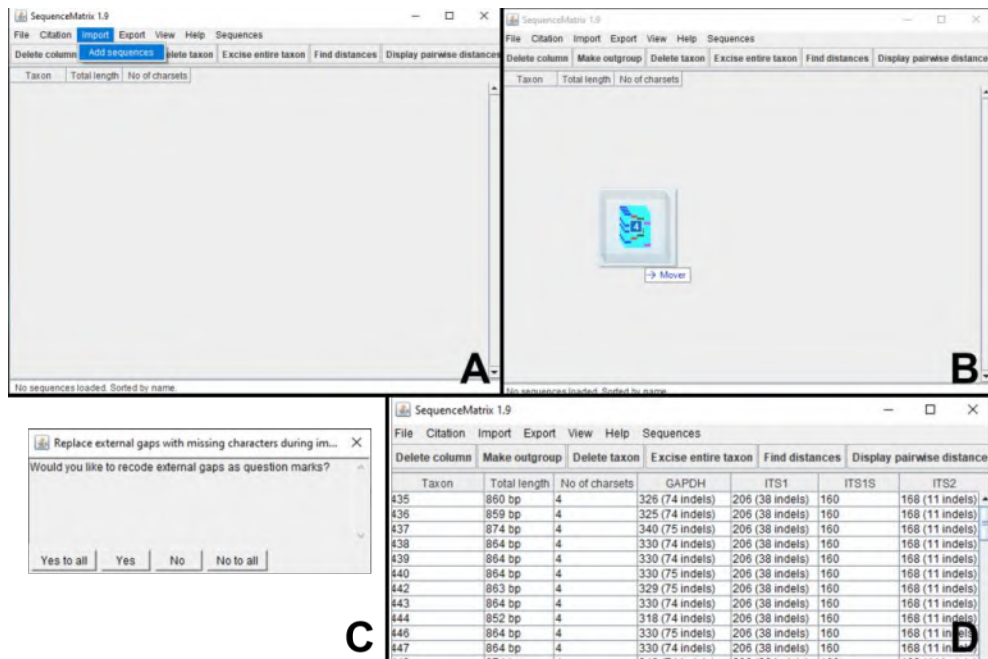


Figura 17. Pasos para cargar alineamientos en Sequence Matrix. A, importar archivos; B, arrastrar archivos de la carpeta; C, cuadro de dialogo para los gaps; D, matriz con cuatro genes cargados.

Descargar matriz concatenada: Export - Export sequences as Nexus (interleaved, 1000 bp) - nombre del archivo: "nombre.nex" - guardar (Matriz para MsBayes-inferencias bayesianas). Export - Export sequences for RAXML analyses on CIPRES - nombre del archivo: "nombre.phi" - guardar (Matriz para RaxmlGUI-máxima verosimilitud) (Fig. 18).

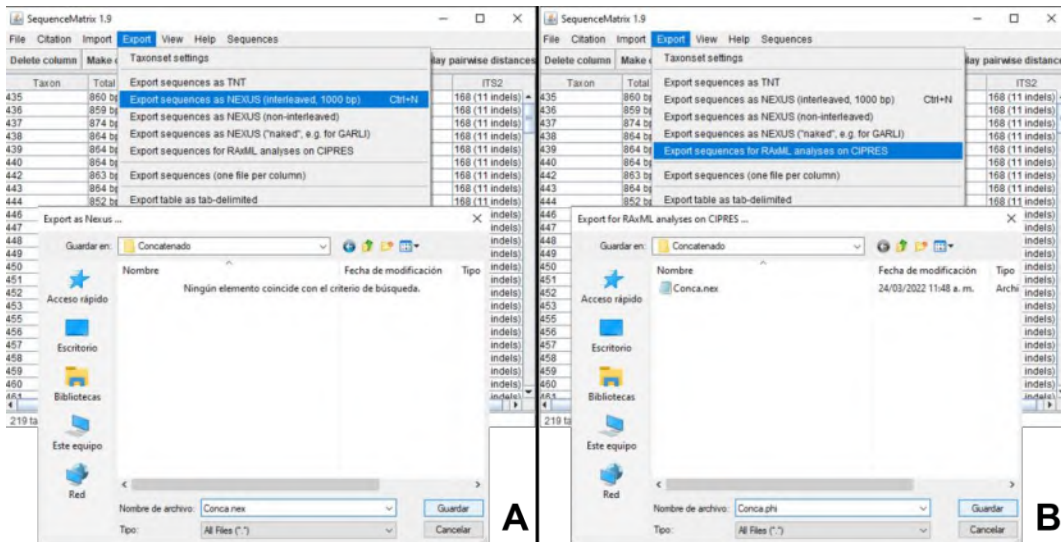


Figura 18. Pasos para exportar las matrices concatenadas. A, archivo nexus (*.nex); B, archivo phylip (*.phy).

11.1.5. Determinar modelo evolutivo. Descargar el programa jModel Test (<https://github.com/ddarriba/jmodeltest2/releases>), para obtener el modelo evolutivo que mejor se aplica para el alineamiento de cada gen utilizado. Abrir jModelTest.jar - File - Load DNA alignment - seleccionar alineamiento (*.fas) - abrir (Fig. 19).

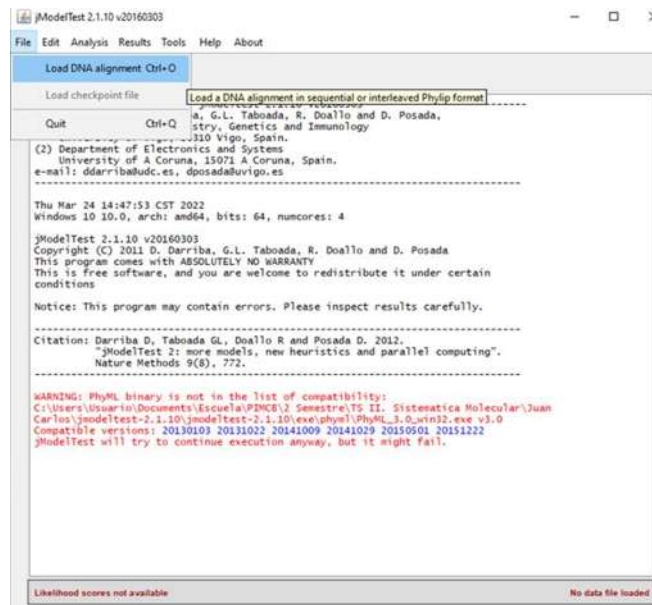


Figura 19. Pasos para cargar un alineamiento en el programa jModelTest.

Para comenzar el análisis, primero se obtiene los puntajes de probabilidad de cada modelo evolutivo, seleccionar Analysis - Compute likelihood scores - Likelihood settings: number of substitution schemes = 11, Base tree search = Best - Compute Likelihoods (Fig.20).

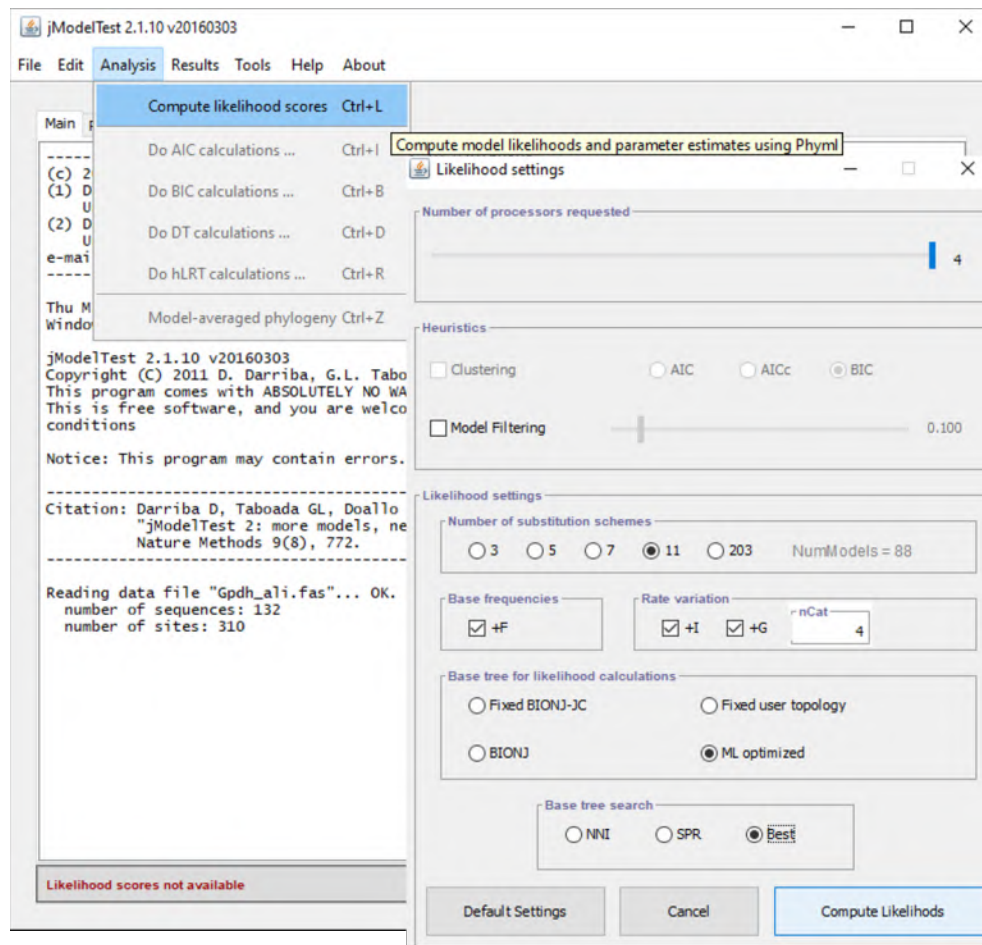


Figura 20. Pasos para iniciar el análisis de los puntajes de probabilidad para cada modelo evolutivo.

Ya que termina el análisis se puede utilizar el criterio Akaike (AIC) o el criterio Bayesiano (BIC) para determinar el mejor modelo evolutivo para el alineamiento utilizado (se debe utilizar el mismo criterio para todos los genes). Seleccionar Analysis - Do AIC calculations/Do BIC calculations - (en el caso de AIC) seleccionar la casilla “use AICc correction” - Do AICc calculations/Do BIC calculations (Fig. 21A, B). Como resultado el programa muestra el modelo seleccionado para el

alineamiento según el criterio utilizado (Fig. 21C, D). Realizar el mismo procedimiento para el alineamiento de todos los genes que se desea utilizar.

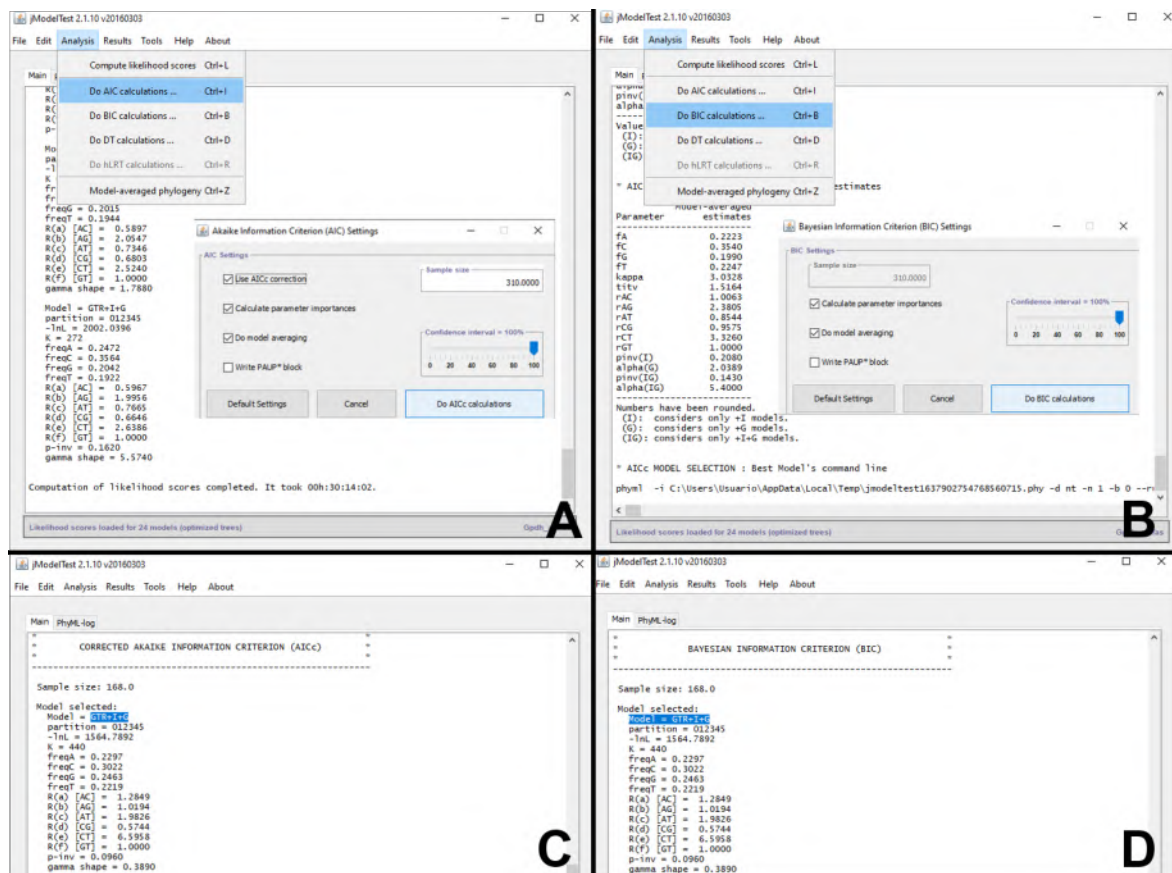


Figura 21. Pasos para los criterios de AIC y BIC para seleccionar un modelo evolutivo adecuado (resaltado en azul). A, pasos para el análisis AIC; B, pasos para el análisis BIC; C, resultados con el criterio AIC; D, resultados con el criterio BIC.

11.1.6. Análisis de Máxima Verosimilitud. Descargar el programa RaxmlGUI (<https://antonellilab.github.io/raxmlGUI/>). Abrir el archivo ejecutable raxmlGUI.exe - Load alignment - Seleccionar matriz concatenada (.phi) - Abrir (Fig. 22).

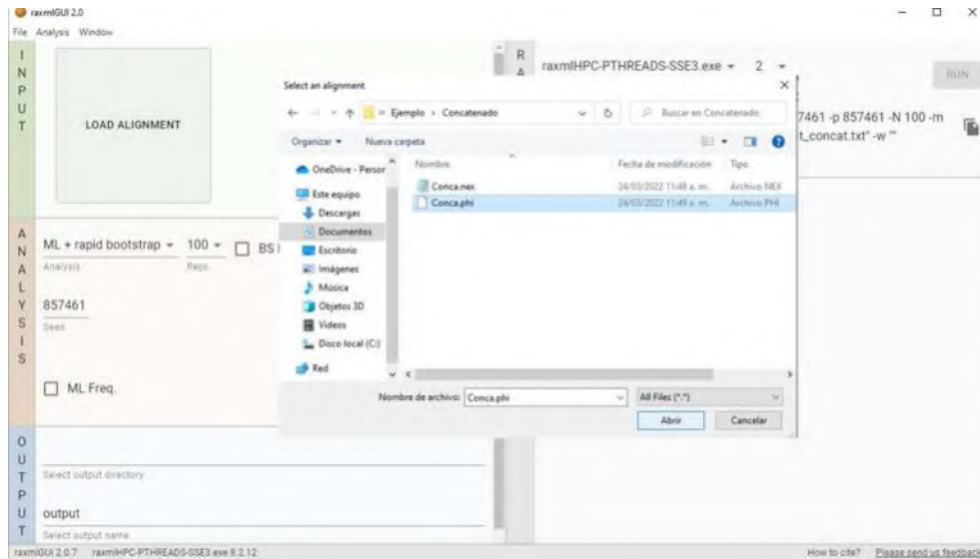


Figura 22. Pasos para cargar matriz concatenada en raxmlGUI.

Después hay que seleccionar las particiones, las cuales se pueden observar en el archivo nexus, hasta abajo (después de las secuencias) comenzando por “Charset”. En la ventana de raxmlGUI, seleccionar menú (Sección “INPUT”, esquina superior derecha, tres puntos) - edit partition - Partition editor: nombre de un gen, que nucleótidos abarca, ADD - Repetir para los demás genes - Back (Fig. 23).

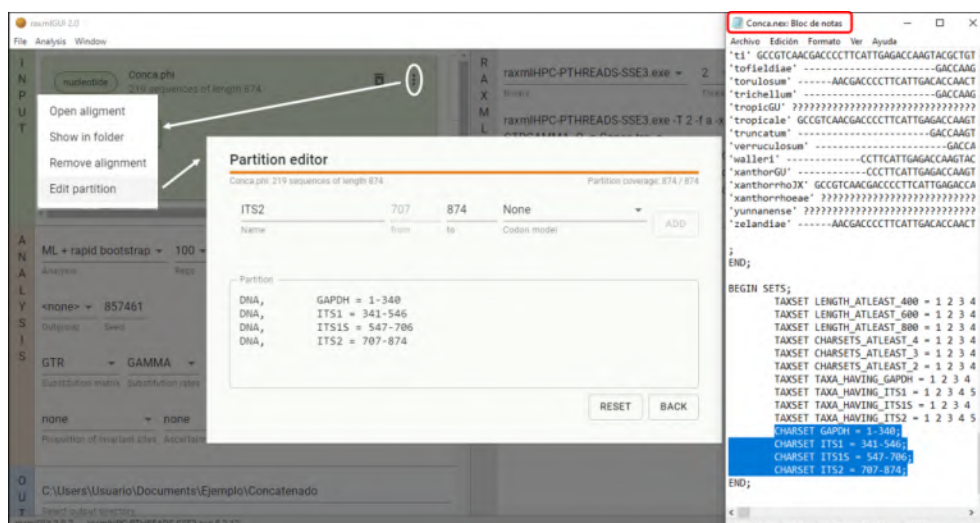


Figura 23. Pasos para agregar las particiones (genes) en la matriz de raxmlGUI. Recuadro rojo: archivo nexus. Resaltado en azul: particiones para los 4 genes.

Comenzar análisis filogenético, en la sección de “Analysis”: Analysis = ML + thorough bootstrap, Reps = 1000, Outgroup = deseleccionar none y seleccionar especie de grupo externo, substitution matrix, substitution rates y proportion of invariant sites = seleccionar de acuerdo al modelo evolutivo elegido. Sección de “Output”: Select output directory = seleccionar carpeta donde se guardarán los resultados, select output name = nombrar archivos de resultados - Sección “RAXML”: RUN (esquina superior derecha) (Fig.24).

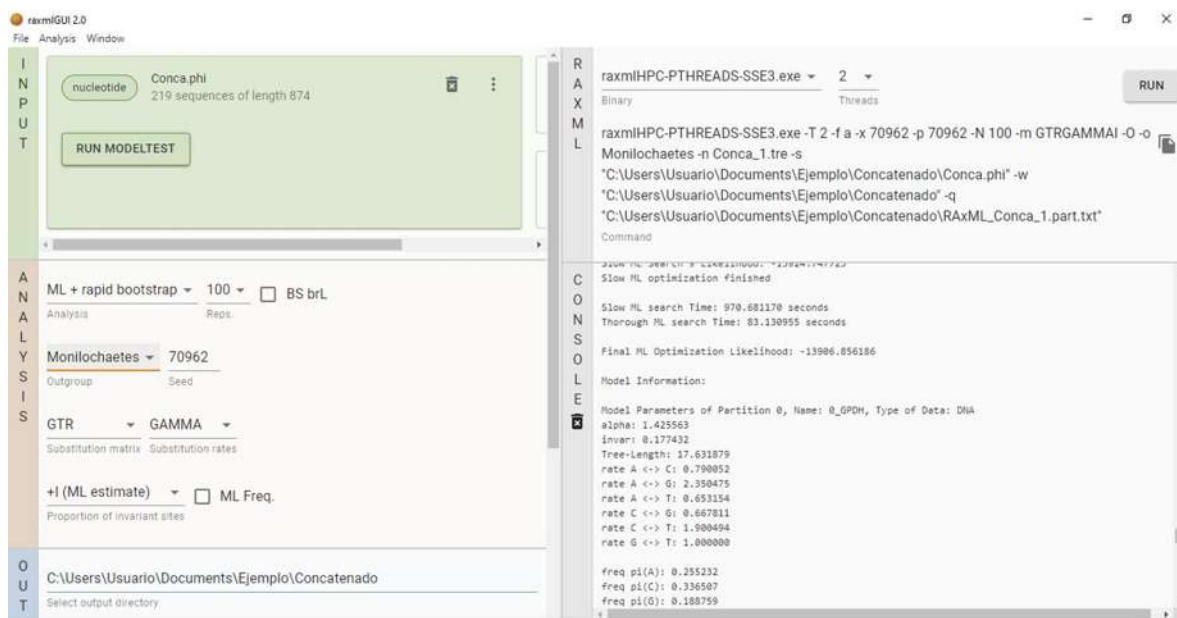


Figura 24. Parámetros para realizar el análisis de máxima verosimilitud en raxmlGUI.

En la sección de “Console” se muestran el progreso del análisis, al comienzo puede desplegarse comentarios como cuando dos o más aislados tienen secuencias idénticas entre sí (Fig. 25A), esto se puede utilizar para seleccionar dos o tres secuencias idénticas que se dejan en el análisis y eliminar las demás. Además, cuando termina de hacer el análisis se muestra el valor Likelihood (Fig. 25B) el cual es importante y se agrega a la figura del árbol. Toda esta información también queda guardada en la carpeta del directorio de trabajo, en un documento que dice info (Fig. 25C).

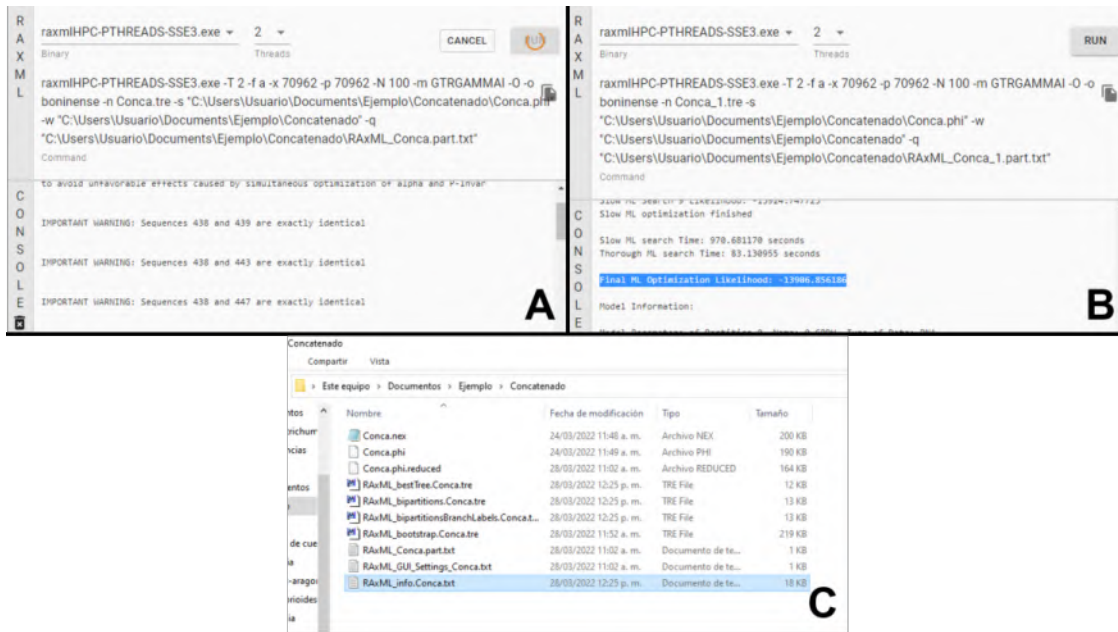


Figura 25. Resultados del análisis filogenético. A, información de las secuencias idénticas; B, valor likelihood (resaltado en azul); C, archivo de la información del análisis.

11.1.7. Inferencias Bayesianas. Se puede descargar MrBayes (<https://nbisweden.github.io/MrBayes/download.html>) o hacer el análisis en línea en la página de CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action#>). El primer paso es modificar el archivo nexus e incluir los comandos de MrBayes, para esto, se utiliza la función de reemplazar (Seleccionar apostrofe de un nombre - Edición - Reemplazar - Reemplazar todo) para quitar las apostrofes de los nombres de las secuencias (Fig. 26A), posteriormente pegar los comandos de MrBayes después del último “end;”, modificar los “charset” de acuerdo a la información de cada gen en la sección de “begin sets” y eliminar toda esa sección al terminar (Fig. 26B). Al final después de las secuencias (“END;”) quedan los comandos de MrBayes (Fig. 26C).

```
begin mrbayes;
  charset GAPDH = 1- 340;
  charset ITS1 = 341- 546;
  charset ITS1S = 547- 706;
  charset ITS2 = 707- 874;
```

```

partition currentPartition = 4: GAPDH, ITS1, ITS1S, ITS2;
set partition = currentPartition;
outgroup Monilochaetes;
lset applyto=(1, 2, 3, 4) nst=6 rates=invgamma;
unlink statefreq=(all) revmat=(all) shape=(all) pinvar=(all);
prset applyto=(all) ratepr=variable;
mcmc ngen= 10000000 relburnin=yes burninfrac=0.25
printfreq=1000 samplefreq=1000 nchains=4 savebrlens=yes;
mcmc;
sumt;
sump;
end;
    
```

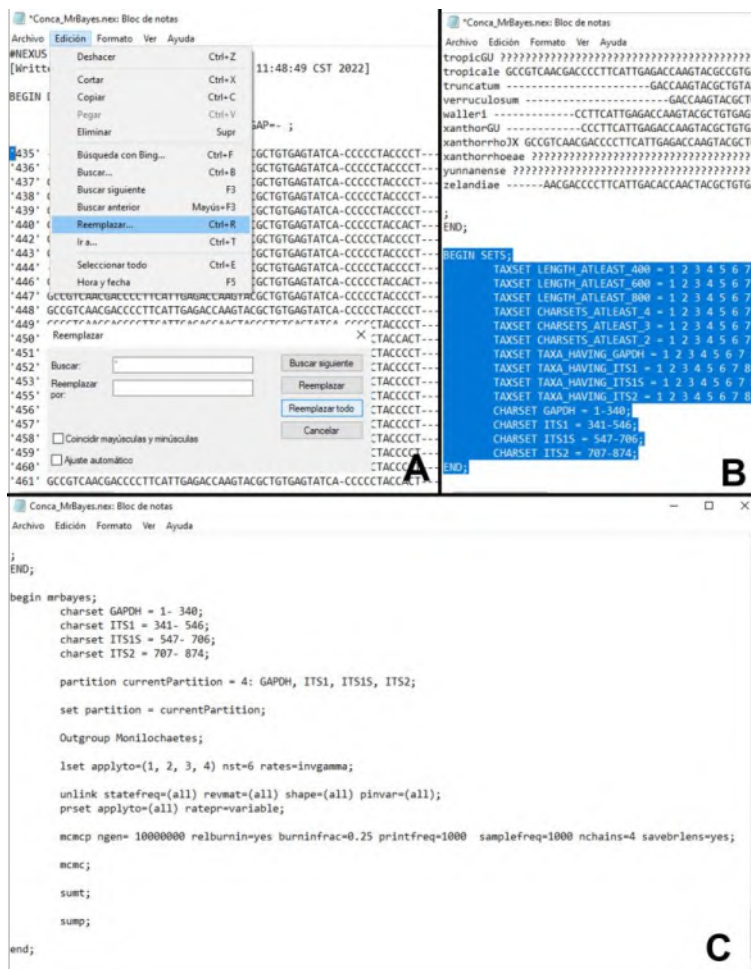
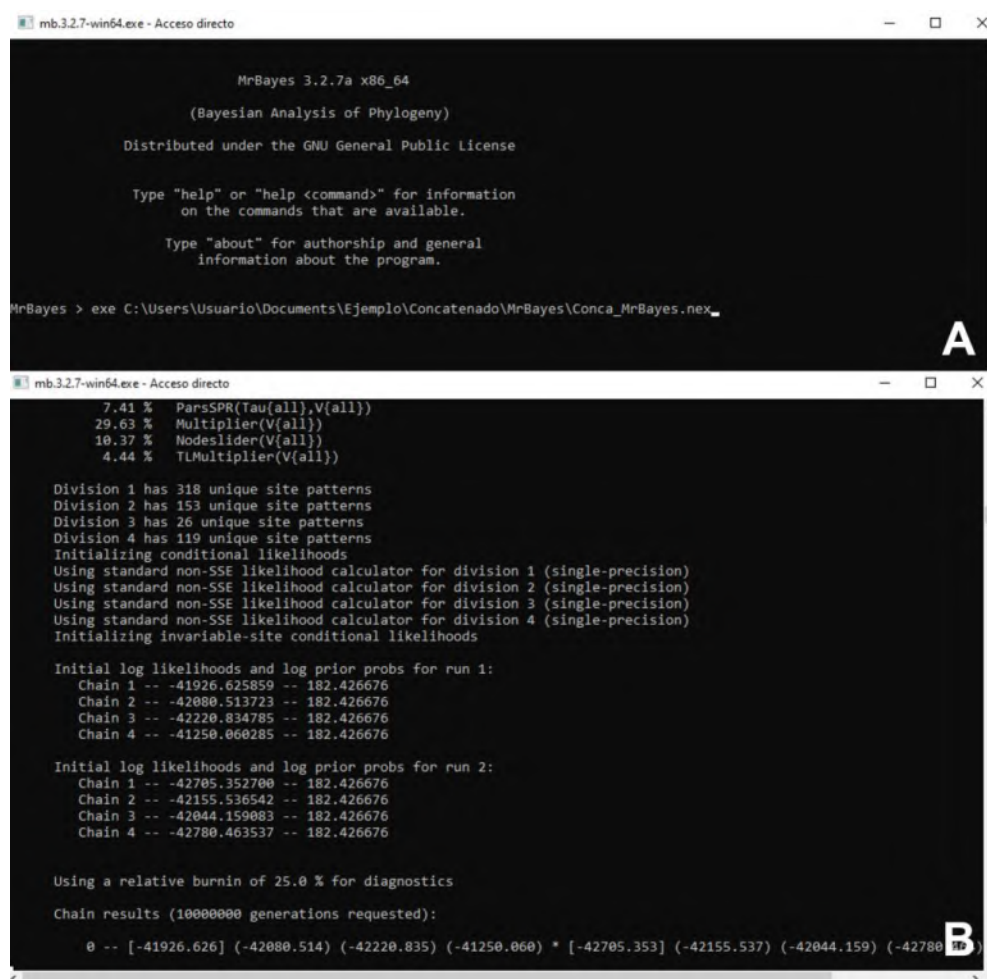


Figura 26. Modificar archivo nexus para ser leído por MrBayes. A, quitar apóstrofo de los nombres de secuencias; B, borrar la selección en azul; C, agregar comandos de MrBayes.

Para ejecutar el análisis de inferencias bayesianas en la aplicación descargable de MrBayes (mencionada al comienzo de esta sección: 11.1.7), primero abrir el archivo ejecutable “mb.3.2.7-win64.exe”; después cargar el archivo nexus (con las secuencias y los comandos), utilizando el comando “exe”, espacio, la ubicación y el nombre del documento nexus (Fig. 27A); después clic en “enter” y comienza el análisis (Fig. 27B). Al terminar el análisis se crean varios archivos en la ubicación del documento nexus, entre ellos uno termina con “.nex.con.tre”, éste es el árbol consenso obtenido.



```
MrBayes 3.2.7a x86_64
(Bayesian Analysis of Phylogeny)
Distributed under the GNU General Public License

Type "help" or "help <command>" for information
on the commands that are available.

Type "about" for authorship and general
information about the program.

MrBayes > exe C:\Users\Usuario\Documents\Ejemplo\Concatenado\MrBayes\Conca_MrBayes.nex_

7.41 % ParsSPR(Tau(all),V(all))
29.63 % Multiplier(V(all))
10.37 % Nodeslider(V(all))
4.44 % TLMultiplier(V(all))

Division 1 has 318 unique site patterns
Division 2 has 153 unique site patterns
Division 3 has 26 unique site patterns
Division 4 has 119 unique site patterns
Initializing conditional likelihoods
Using standard non-SSE likelihood calculator for division 1 (single-precision)
Using standard non-SSE likelihood calculator for division 2 (single-precision)
Using standard non-SSE likelihood calculator for division 3 (single-precision)
Using standard non-SSE likelihood calculator for division 4 (single-precision)
Initializing invariable-site conditional likelihoods

Initial log likelihoods and log prior probs for run 1:
Chain 1 -- -41926.625850 -- 182.426676
Chain 2 -- -42080.513723 -- 182.426676
Chain 3 -- -42220.834785 -- 182.426676
Chain 4 -- -41250.060285 -- 182.426676

Initial log likelihoods and log prior probs for run 2:
Chain 1 -- -42705.352700 -- 182.426676
Chain 2 -- -42155.536542 -- 182.426676
Chain 3 -- -42044.159083 -- 182.426676
Chain 4 -- -42780.463537 -- 182.426676

Using a relative burnin of 25.0 % for diagnostics

Chain results (10000000 generations requested):
0 -- [-41926.626] (-42080.514) (-42220.835) (-41250.060) * [-42705.353] (-42155.537) (-42044.159) (-42780.463)
```

Figura 27. Iniciar análisis de las inferencias bayesianas utilizando un archivo ejecutable de MrBayes. A, comando para cargar el documento; B, inicio adecuado del análisis sin mensajes de advertencia.

Por otro lado, para hacer el análisis en línea, se debe registrar una cuenta en la página de CIPRES, después crear una carpeta de trabajo, seleccionar “Create new folder” - Entre folder detail: Label = nombre de la carpeta, description = pequeña descripción de la carpeta - Save (Fig. 28A). Después, en el nuevo folder creado (esquina superior izquierda), entrar al apartado de “Data” para cargar el archivo de MrBayes, seleccionar “Upload/Enter Data - Upload File: elegir archivo - Save (Fig. 28B).

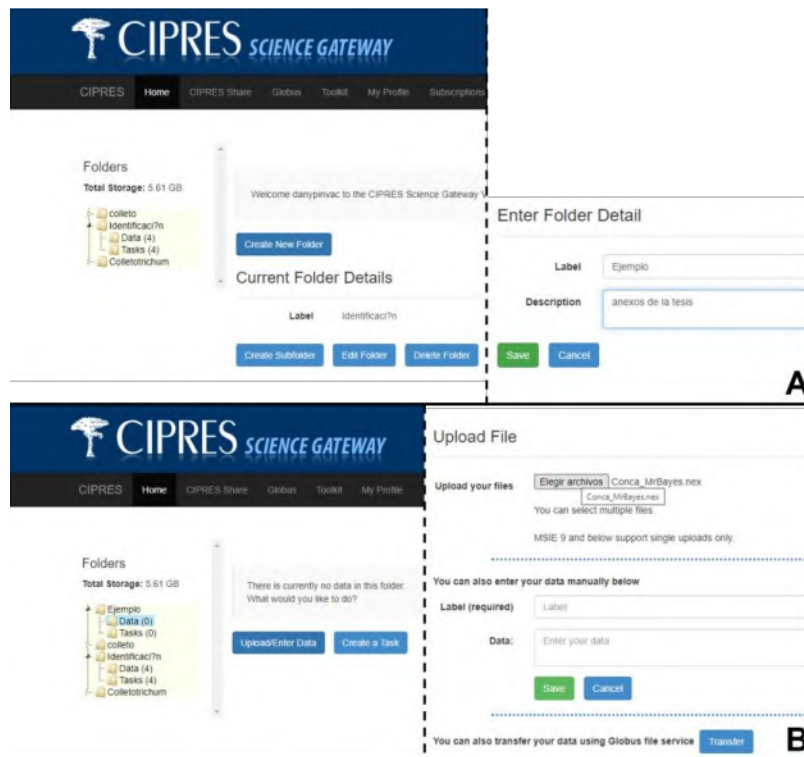


Figura 28. Crear un nuevo folder (A) y cargar archivo de MrBayes (B) en la página de CIPRES. Líneas punteadas = pasos siguientes.

Posteriormente, se crea una nueva tarea para iniciar con los análisis de las inferencias posteriores, entrar en “tasks” - Create New Task (Fig. 29A) - Select input data (Fig. 29B) - Seleccionar archivo de MrBayes - Select Data (Fig. 29C) - Seleccionar la herramienta de “MrBayes on XSEDE” (Fig. 29D) - entrar en “148 parameters set” (Fig. 29E) - Seleccionar la casilla de “My Data Contains a MrBayes Data Block” y cambiar las horas de corrida máxima a 8 (Maximum Hours to Run) -

Save parameters (Fig. 29F) - Agregar descripción - Save task/Save and Run Task (Fig. 29G) - Seleccionar Run task y/u observar resultados del análisis cuando esté listo (Fig. 29H).

A Home page showing folders and a 'Create New Task' button.

B 'Create new task' form with tabs: Task Summary, Select Data, Select Tool, Set Parameters. Fields include Description, Input (Select Input Data), Tool (Select Tool), and Input Parameters (Set Parameters). Buttons: Save Task, Save and Run Task, Discard Task.

C Table of available tools:

Select One	Label	Size	Data Format	Date Created	Parse Status
<input checked="" type="checkbox"/>	Conica_MrBayes.nex	192.14 KB	Nexus [nex]	3/28/22, 13:53	Successful

D Selection of 'MrBayes on XSEDE (3.2.1)' - Tree Inference Using Bayesian Analysis - run on XSEDE.

E Confirmation: Tool 'MRBAYES_XSEDE' successfully set to current task.

F Configuration of parameters for 'MrBayes on XSEDE: Tree Inference Using Bayesian Analysis - run on XSEDE'. Fields include: My Data Contains a MrBayes Data Block (checked), My MrBayes Block specifies number (2), My MrBayes Block specifies rechain? (4), Maximum Hours to Run (0), My Data Type (nucleic acid), and various checkboxes for memory, scientific notation, and decimal precision.

G Saving the task. Buttons: Save Task, Save and Run Task, Discard Task.

H Overview of the task list. Shows CPU usage, expiration time, and a table of tasks.

Select All	Label	Tool	Input	Parameters	Date Created	Action
<input type="checkbox"/>	Conica	MrBayes on XSEDE	View (1)	View (7)	3/28/22, 13:53	Run Task

Figura 29. Pasos para crear una nueva tarea en la página de CIPRES. A-H, pasos consecutivos para realizar los análisis de inferencias bayesianas en línea. Línea punteada = abajo en la misma página.

Al terminar el análisis, la sección de “action” (Fig. 29H) cambia por “View Output”, al entrar se muestran todos los archivos del análisis y hay que descargar el que termina en “.nex.con.tre”.

Tanto este árbol como el que se crea en el programa de MrBayes se pueden abrir con el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), abrir el archivo ejecutable “FigTree v1.4.4.exe” - File - Open - Seleccionar archivo “.nex.con.tre” - Abrir (Fig. 30A). Para mostrar los valores de las probabilidades posteriores, seleccionar la casilla de “Node labels” - Display = prob (Fig. 30B). Para ver el valor de cada clado se puede utilizar la barra de zoom lo cual se utilizará posteriormente al editar el árbol.

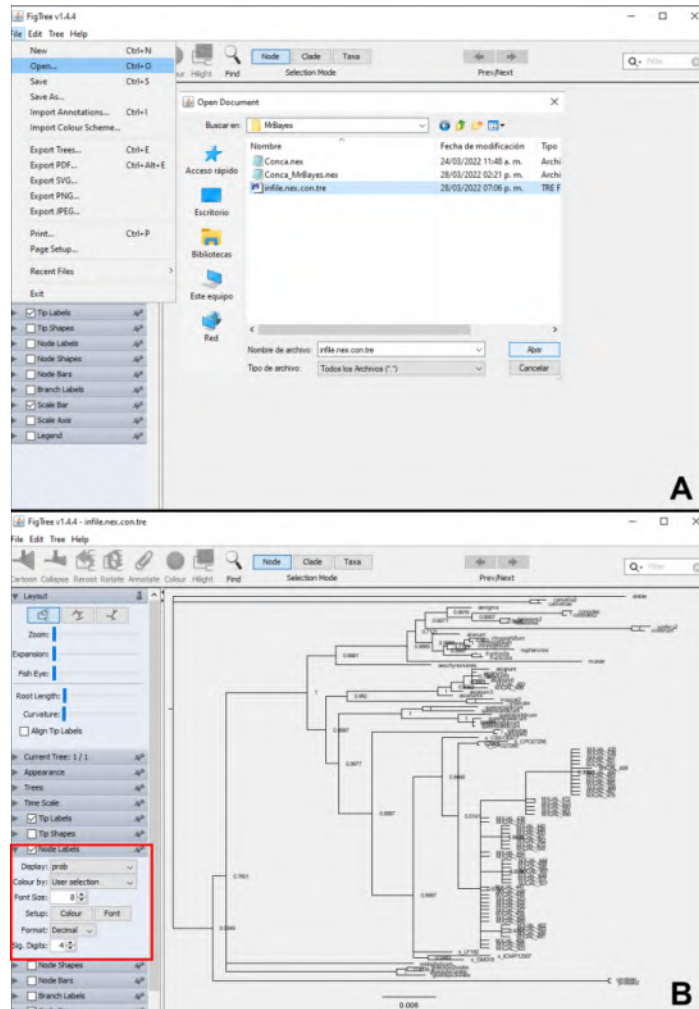


Figura 30. Visualizar árbol obtenido de MrBayes con FigTree. A, abrir archivo del análisis; B, mostrar valores de probabilidades posteriores.

11.1.8. Árbol filogenético. Utilizando los árboles obtenidos del análisis de máxima verosimilitud y el de inferencias bayesianas se crea una imagen consenso. Primero se guarda como imagen el árbol obtenido del análisis de Máxima verosimilitud con el programa FigTree, abrir el archivo ejecutable “FigTree v1.4.4.exe” - File - Open - Seleccionar archivo de raxmlGUI con el nombre de “bipartitions” - Abrir - Aceptar (Fig. 31).

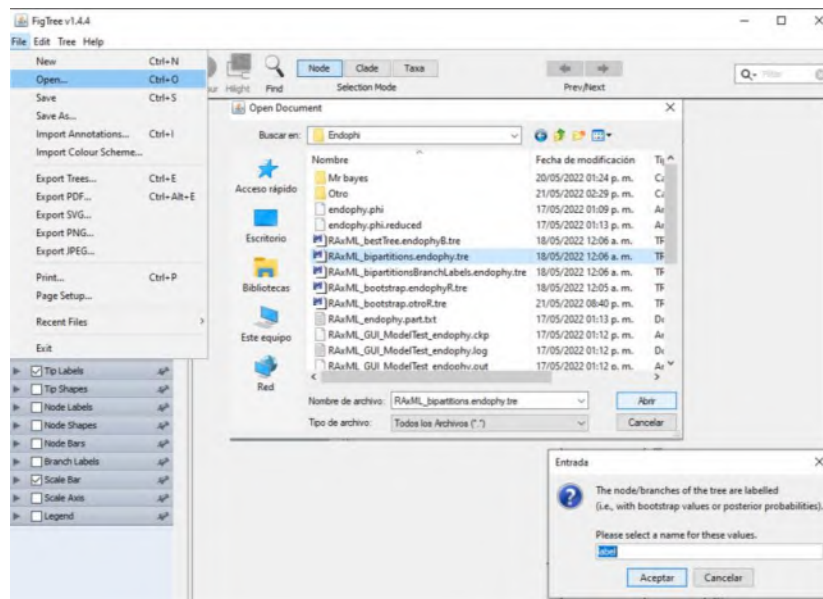


Figura 31. Pasos para visualizar el árbol filogenético de máxima verosimilitud en FigTree.

Primero hay que seleccionar el grupo externo y enraizar el árbol (click en “reroot”) (Fig. 32A). Para colapsar las ramas donde se encuentran los aislados del trabajo, seleccionar la rama que los separa de otras especies - click “collapse”, repetir procedimiento para la otra especie (Fig. 32B). Después modificar la visualización del árbol, aumentar el tamaño de la raíz para hacer el árbol más estrecho (pestaña Layout - “Root Length”), ordenar los nodos de forma ascendente (pestaña Trees - activar “order nodes”) y mostrar los valores bootstrap (seleccionar “node labels” - Display: label) (Fig. 32C). Por, último, el árbol se guarda como archivo de imagen PNG en File - Export PNG - Seleccionar carpeta - nombrar archivo “*.png” - aceptar (Fig. 33), además, se guardan copias con las ramas no colapsadas.

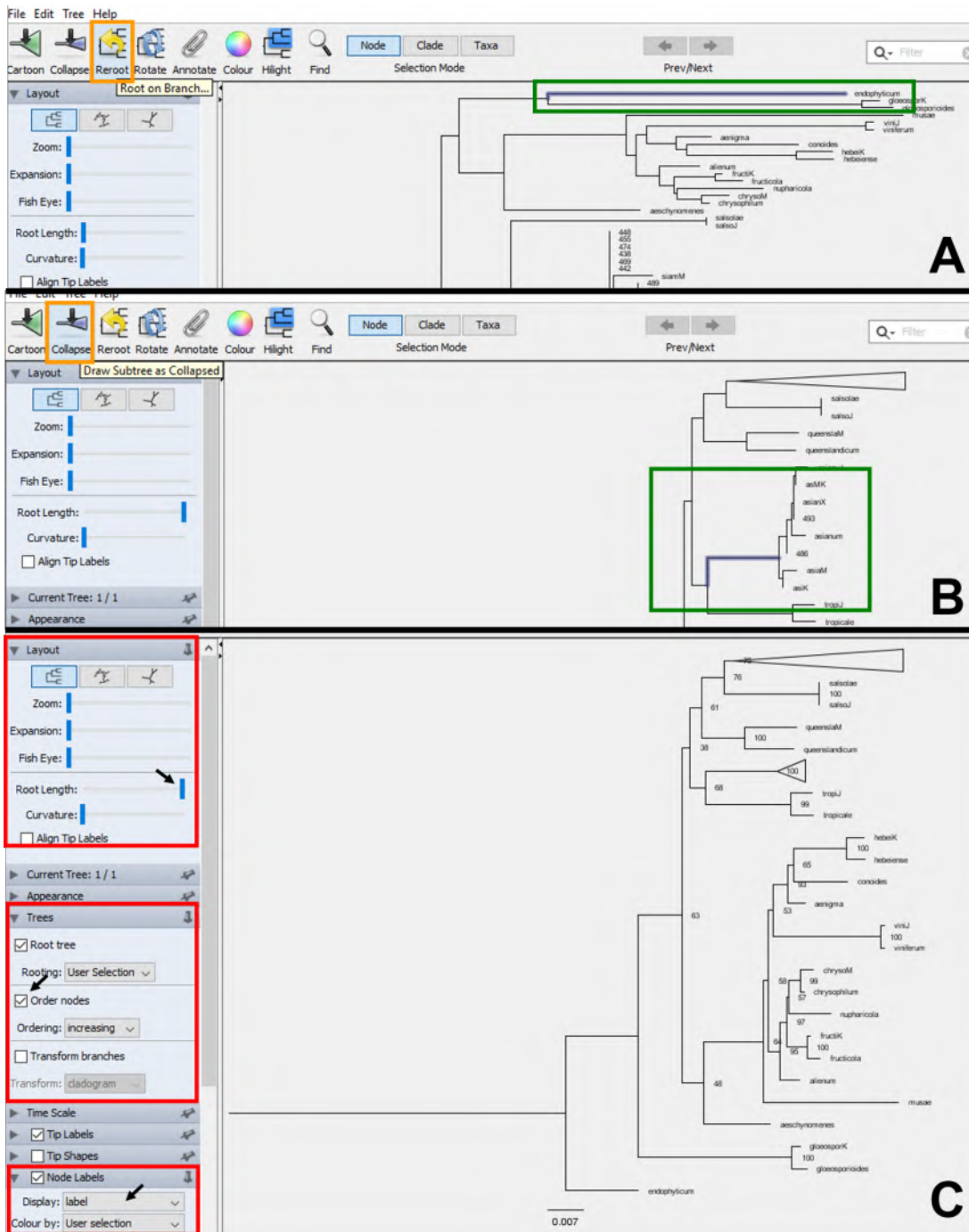


Figura 32. Pasos para modificar la visualización del árbol filogenético de máxima verosimilitud. A, enraizar el árbol seleccionando el grupo externo; B, colapsar las ramas de las especies donde se agrupan los aislados; C, pestañas para cambiar el tamaño de la raíz, el orden de los nodos y mostrar los valores bootstrap (Cuadros rojos). Cuadros naranjas = botones del árbol. Cuadros verdes = seleccionar ramas. Flechas negras = opciones de cada pestaña.

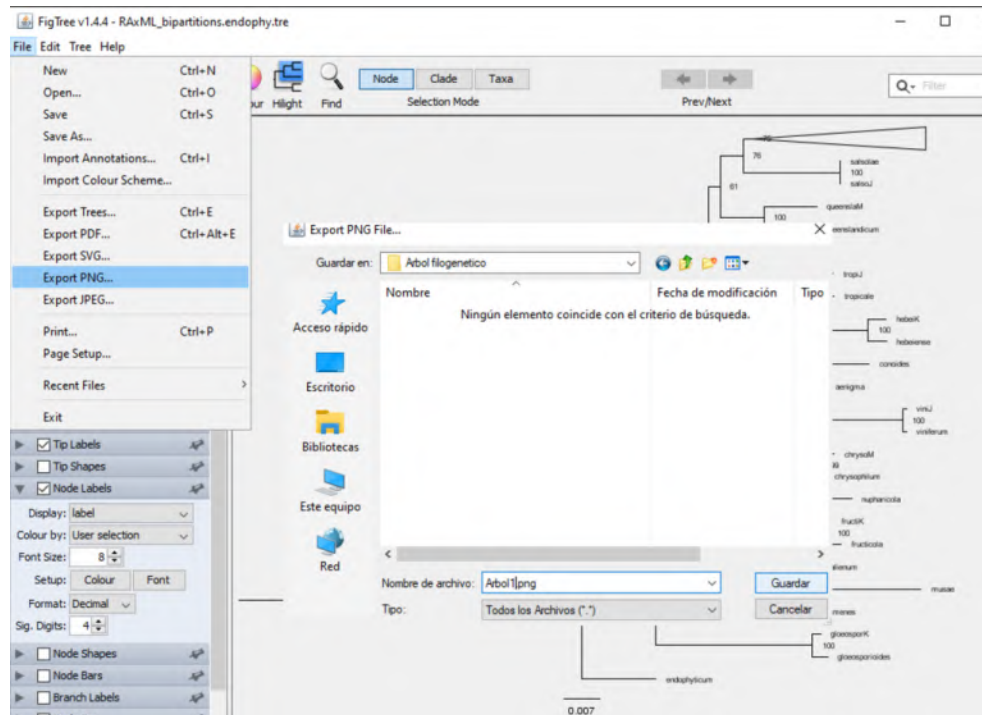


Figura 33. Pasos para guardar el árbol filogenético como imagen en FigTree.

Para editar el árbol guardado, se utiliza PowerPoint, primero hay que modificar las dimensiones de las diapositivas, Diseño - Personalizar: Tamaño de diapositiva - Personalizar tamaño de diapositiva - Ancho: 20 cm, Largo: 30cm - Aceptar - Asegurar el ajuste (Fig. 34). La imagen del árbol se inserta en la diapositiva (Insertar - Imágenes - Imágenes - Este dispositivo - Seleccionar archivo - Abrir). Para mejorar la calidad del árbol redibujar las ramas colocando líneas sobre la imagen (Inicio - Dibujo: Línea), en la pestaña de formato se modifica el color y grosor de la línea (Formato - Estilo de Forma - Contorno de Forma - Seleccionar color negro - grosor - 1½ pto) (Fig. 35).

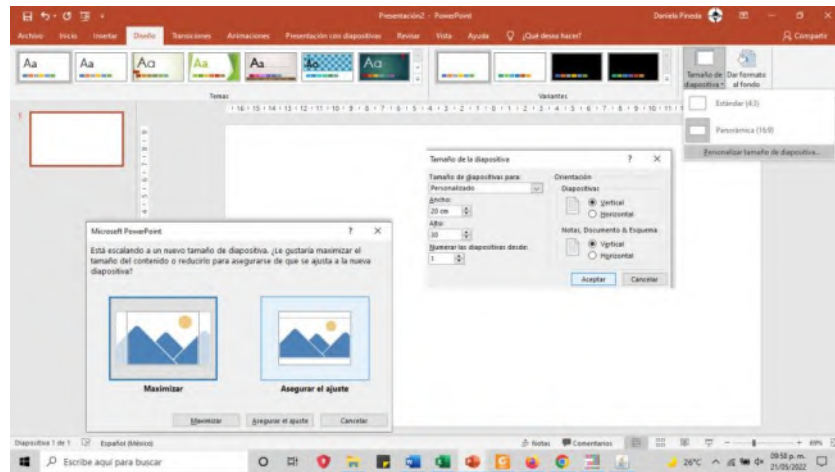


Figura 34. Modificar las dimensiones de las diapositivas en PowerPoint.

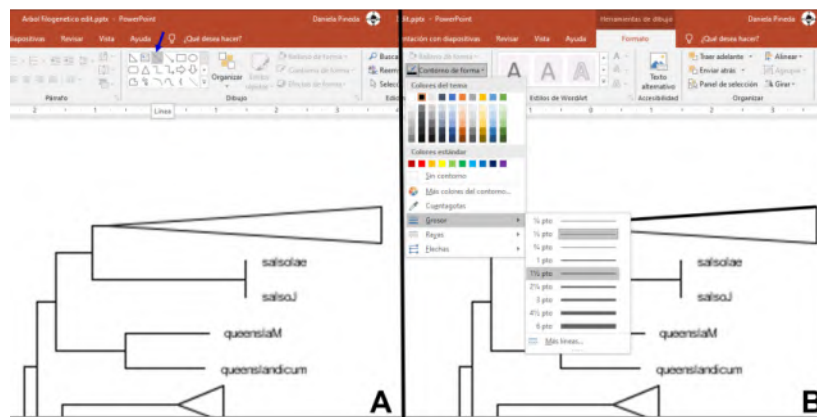


Figura 35. Pasos para reemplazar ramas del árbol filogenético. A, crear líneas sobre las ramas; B, modificar el color y grosor de las líneas. Flecha azul = botón de para crear líneas.

Una vez que se completaron las ramas, se crean nuevas etiquetas (Inicio - Dibujo: Cuadro de texto) con el nombre completo de las especies y el aislado (Fig. 36A), acomodar cuadro de texto al final de cada rama, además se agregan los valores bootstrap y las probabilidades posteriores a los nodos (en base a los árboles obtenidos de los análisis), separadas con un paréntesis (Fig. 36B), en caso de que no haya espacio en la rama para colocar los valores, se sitúan cerca de esa rama en un lugar donde no obstruyan la visualización de los otros componentes del árbol y con una línea negra se indica su posición.

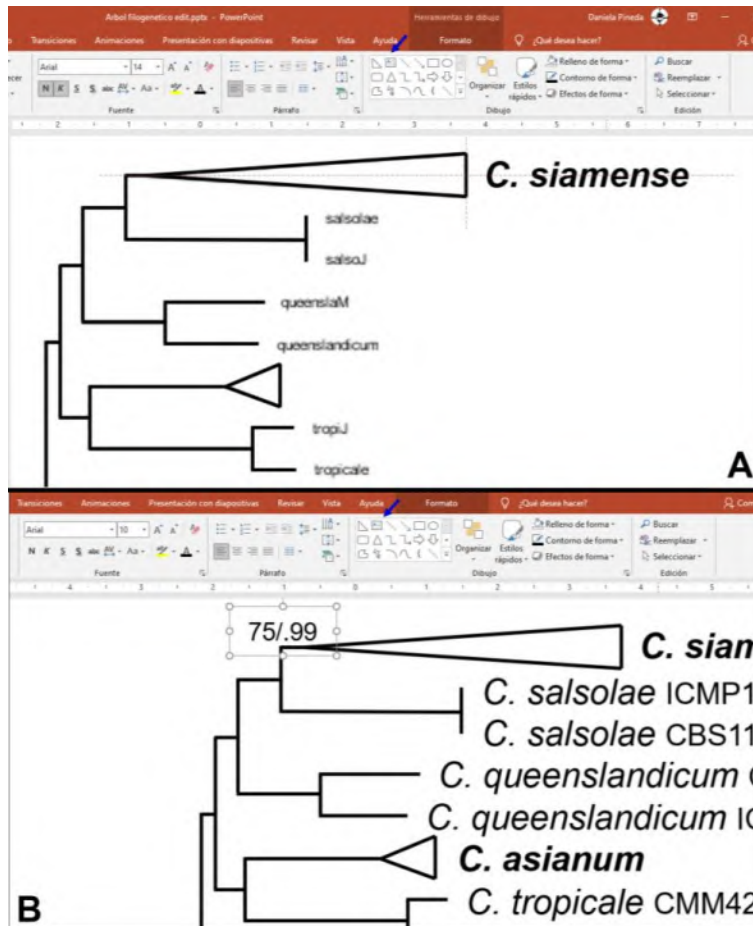


Figura 36. Pasos para reemplazar las etiquetas del árbol filogenético. A, colocar etiquetas con nombres, alinear texto con la rama; B, colocar valores bootstrap y probabilidades posteriores sobre los nodos. Flechas azules = botón para crear cuadros de texto.

Borrar la imagen del árbol que se utilizó como guía, después, seleccionar todo - click en la diapositiva - Ctrl+E - click derecho en selección - guardar como imagen - seleccionar carpeta - nombrar archivo - Guardar (Fig. 37). Se repite este procedimiento para los árboles por separado de las especies con las ramas colapsadas.

Por último, se insertan las imágenes de los tres arboles creados (Árbol completo, clado *C. siamense*, clado *C. asianum*), se acomodan de tal manera que todas se puedan ver bien, y agregar una sección con la información del análisis (genes utilizados separados por un "+", tamaño de la matriz concatenada, modelo

evolutivo utilizado y el valor likelihood) y encuadrar (Formato - Insertar formas: editar forma - Cambiar forma - Rectángulo: esquinas redondeadas) (Fig. 38A). También, agregar contorno a las imágenes de los clados para separar las secciones (Formato - Estilos de imagen: borde de imagen) (Fig. 38B). Para enmarcar todo, crear un rectángulo y seleccionar la opción “sin relleno” (Formato - Relleno de forma). Para guardar como imagen se sigue el mismo procedimiento antes mencionado, para guardar los árboles por separado.

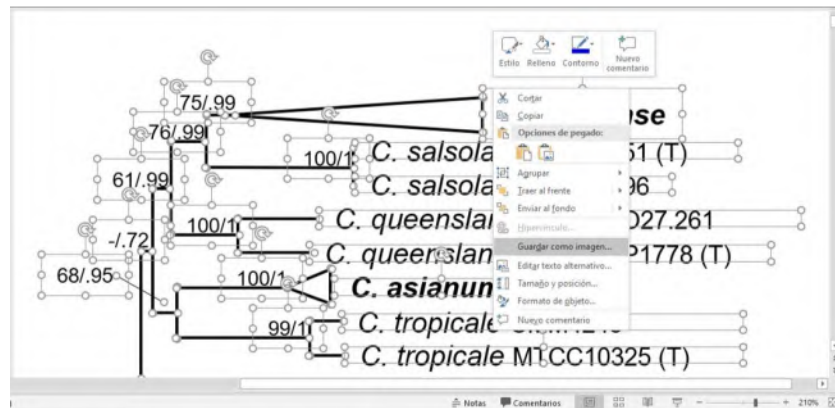


Figura 37. Pasos para guardar el árbol como imagen después de seleccionar todas las líneas y cuadros de texto creados.

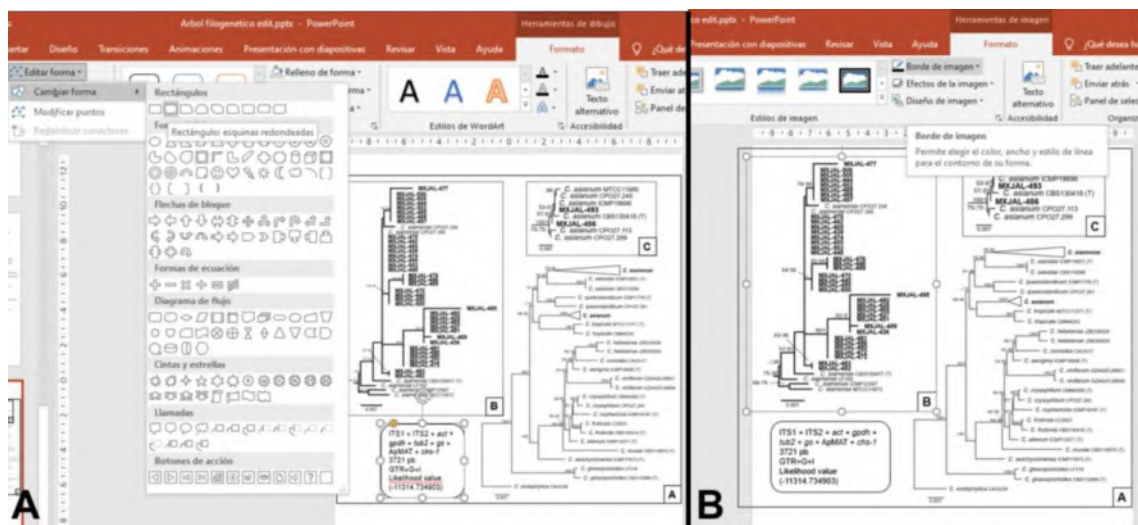


Figura 38. Modificar figura final. A, agregar cuadro con la información del análisis; B, enmarcar los clados de las especies.

11.2. Análisis en GenAlex

11.2.1. Matriz Binaria. Hacer una matriz binaria con los tamaños de bandas de un oligonucleótido para cada aislado de una especie, 1 para los que tienen la banda y 0 para los que no la tienen. Hacer lo mismo para los demás oligonucleótidos (los aislados tienen que estar en el mismo orden). Después, juntar las matrices una después de la otra sin dejar espacios, marcando las columnas con el oligonucleótido correspondiente (Fig.39).

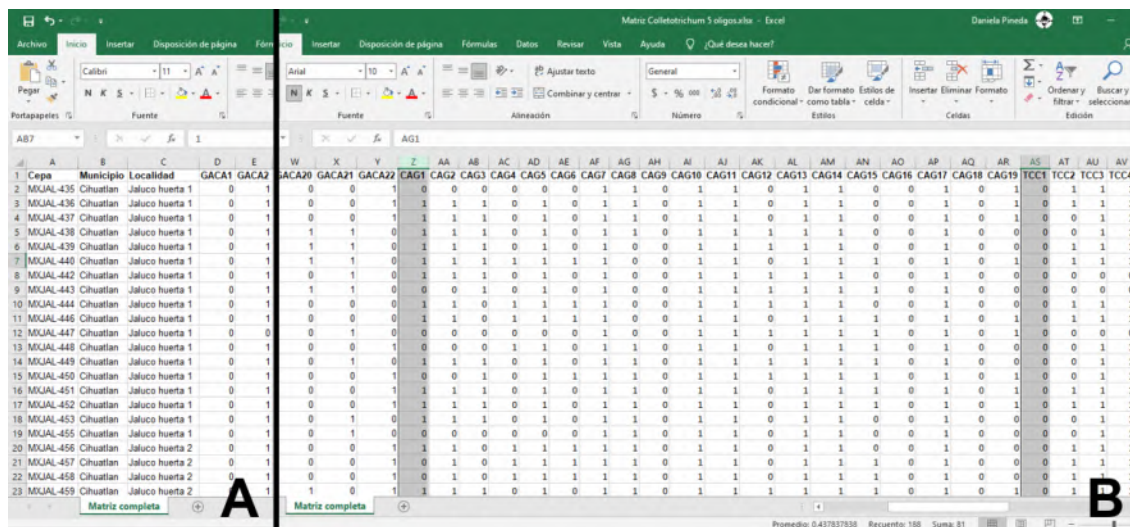


Figura 39. Ejemplo de matriz binaria de *C. siamense* aislado de antracnosis en mango, utilizando cinco oligonucleótidos ISSR. A, comienzo de la matriz y las etiquetas; B, mitad de la matriz ejemplificando como donde se unen las matrices de tres oligonucleótidos.

11.2.2. Matriz GenAlex. Eliminar la columna de municipios, modificar las columnas del aislado y localidades; cambiar código del aislado (primera letra del sitio y últimos 2 números del código de laboratorio), dejar el nombre de los sitios sin espacios. Agregar una fila al inicio, cada celda con la siguiente información: marcadores (número de bandas en total), individuos, poblaciones, muestras de cada población, regiones, muestras por región (cada una en celdas diferentes). Agregar segunda fila con las etiquetas para poblaciones y regiones (debajo de cada celda con el numero correspondiente al lugar) (Fig. 40). Descargar el programa

GenAlex (<https://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Download.html>) y abrir el archivo “GenAIEx 6.51b2.xlam”. Al abrir GenAlex se crea una pestaña nueva en la cinta de opciones de Excel (Fig. 41).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	93	62	4	18	26	6	12	2	44	18						
2				Jaluco1	Jaluco2	Cascabeles	AguaCaliente		Region1	Region2						
3	code	site	GAC1	GAC2	GAC3	GAC4	GAC5	GAC6	GAC7	GAC8	GAC9	GAC10	GAC11	GAC12	GAC13	GAC14
4	J35	Jaluco1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
5	J36	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
6	J37	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
7	J38	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
8	J39	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
9	J40	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
10	J42	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
11	J43	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
12	J44	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
13	J46	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
14	J47	Jaluco1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
15	J48	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
16	J49	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
17	J50	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
18	J51	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
19	J52	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
20	J53	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
21	J55	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0

Figura 40. Ejemplo de la matriz para hacer los análisis en GenAlex.



Figura 41. Pestaña de GenAlex en Excel.

11.2.3. Análisis exploratorios. Frequency based - frequency - Allele Frequency Data Parameters: #Loci (A1) = marcadores, #Samples (B1) = individuos, #Pops (C1) = poblaciones, Pop.size = muestras de cada población, marcar la casilla “binary (diploide)” - OK - Marcar casillas “Frequency & Heterozygosity by Pop (Allele Frequency and heterozydosity)” y “Nei Unbiased Distance” (Multiple Pop Options) - OK (Fig. 42).

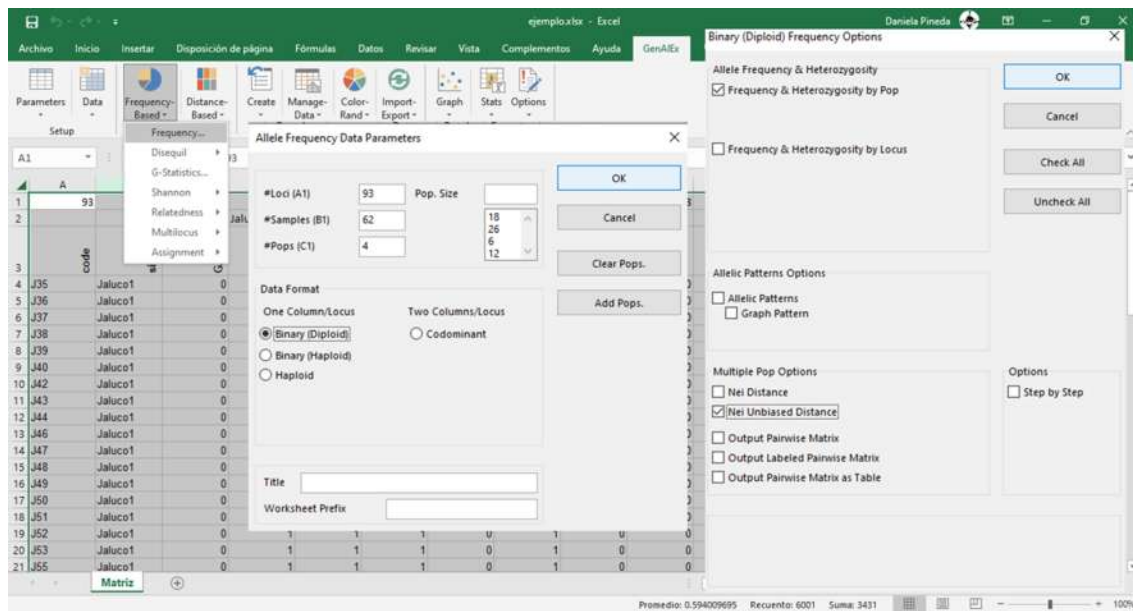


Figura 42. Pasos a seguir para comenzar los análisis exploratorios en GenAEx.

Como resultado se crean dos pestañas nuevas en el libro de Excel. En la pestaña con el nombre BAFF, primero hay una matriz con los datos, después se muestra el resumen de los resultados del análisis de frecuencias y los valores importantes a observar son el porcentaje de loci polimórficos (%P), la heterocigosidad (H_e) y, en caso de que se necesite, el índice de Shannon (I) (Fig. 43), los cuales deben de coincidir con los resultados en POPPR. En la pestaña uNeiP se muestra un cuadro con los valores de la distancia y la identidad genética de Nei entre las poblaciones, esto indica que entre más grande es el valor las poblaciones son más diferentes y si el valor es pequeño las poblaciones son más similares (Fig. 44).

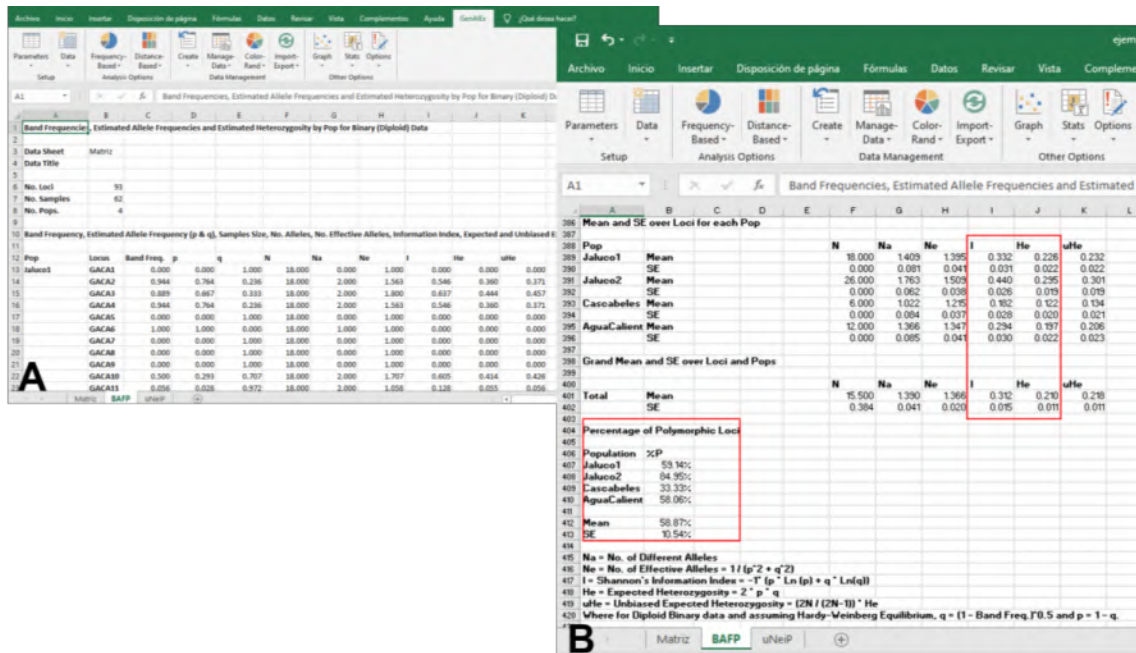


Figura 43. Pestaña BAFP de los resultados del análisis de frecuencias. A, comienzo de la página; B, final de la página con el resumen de los resultados. Cuadros rojos, valores a considerar como la heterocigosidad esperada (He), el porcentaje de loci polimórficos (%P) y el índice de Shannon (I).

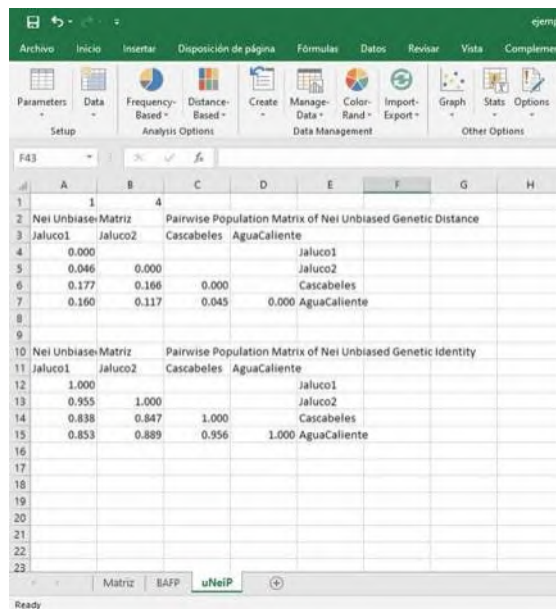


Figura 44. Pestaña uNeiP de los resultados del análisis de frecuencias. Matices con la distancia y la identidad genética de Nei.

11.2.4. Análisis molecular de varianza (AMOVA). ubicarse en la pestaña de la matriz - entrar a Distance based - AMOVA - Revisar que los datos de la matriz sean los correctos - OK - Seleccionar las casillas “Binary (Diploid)” (Distance calculation), “Analysis for Total Only” (Amova locus analysis options) y “Sample” (Output) - OK - 999 permutations, seleccionar la casilla “Output Pairwise PhiPT Matrix” (Pairwise population options) - OK (Fig. 45).

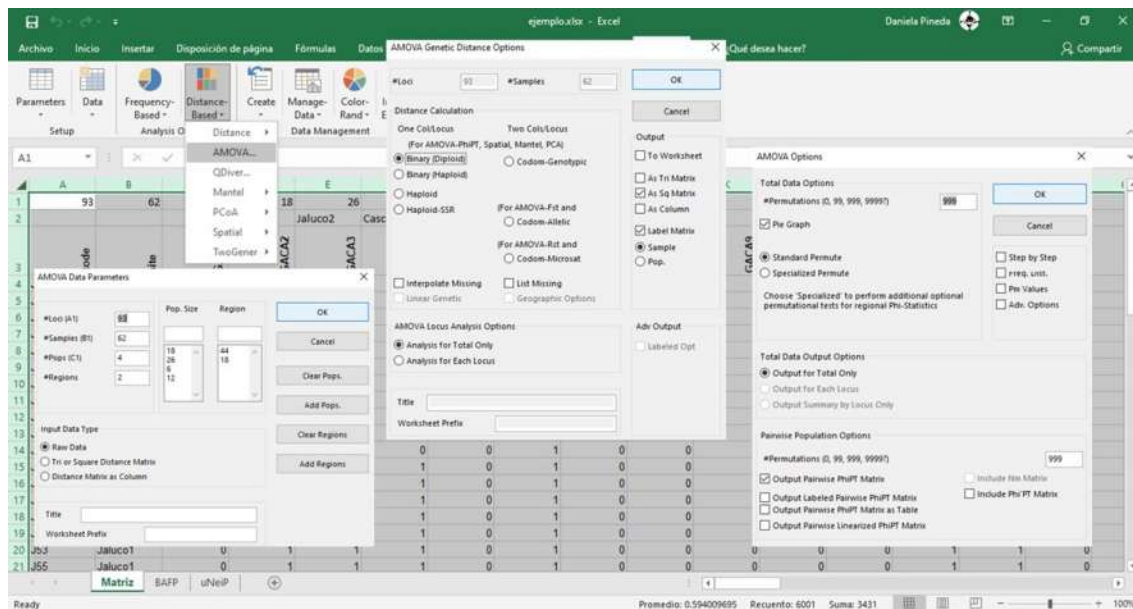


Figura 45. Pasos a seguir para realizar el análisis molecular de varianza (AMOVA) en GenAlex.

Como resultado se vuelven a crear dos pestañas nuevas en el libro, la pestaña PhiPT contiene una gráfica de pastel con los porcentajes de la varianza y más abajo se muestra el cuadro del análisis AMOVA (Fig.46). En la pestaña PhiPTP se muestra un cuadro con medidas de distancia genética que se derivan a partir de la frecuencia y la varianza de los diferentes alelos (esta pestaña es utilizada en el análisis de Mantel) (Fig. 47).

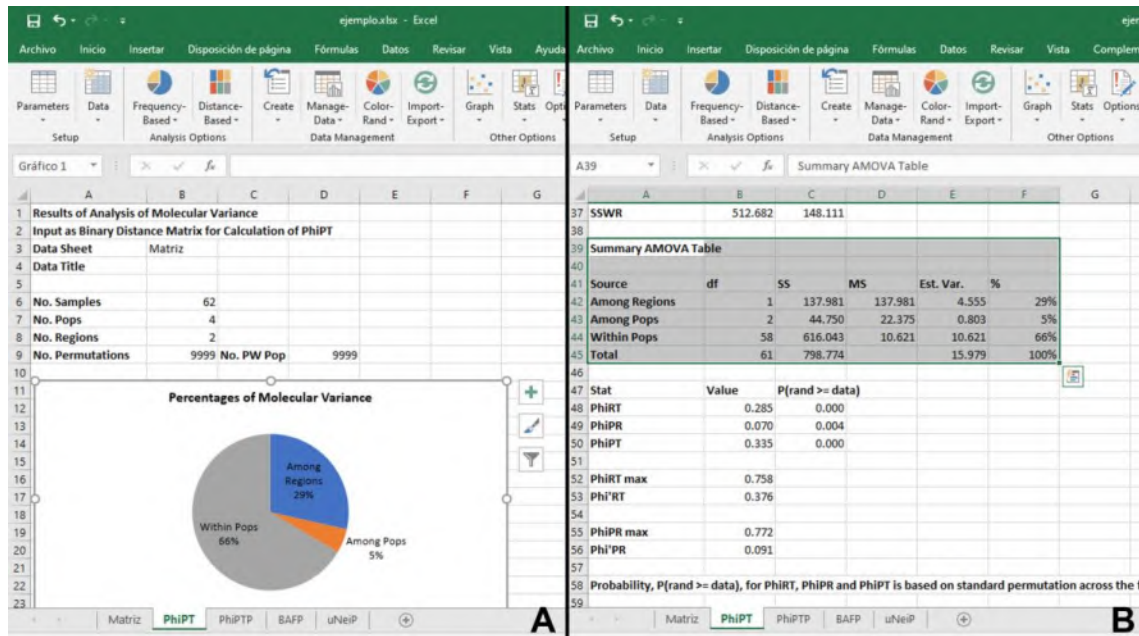


Figura 46. Pestaña PhiPT del AMOVA. A, comienzo de la página se muestra la gráfica de pastel con los porcentajes de la varianza; B, final de la página con cuadro del AMOVA.

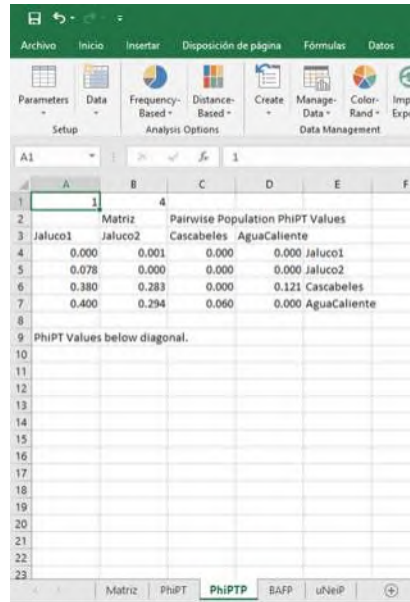


Figura 47. Pestaña PhiPTP del AMOVA. Muestra una matriz con las distancias genéticas entre las poblaciones.

11.2.5. Prueba de Mantel. se hace una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, por lo tanto, se necesita agregar una pestaña con las coordenadas de los sitios en formato decimal (Fig. 48).

	A	B	C	D	E	F	G
1		1		4			
2							
3			cd	lat	lon		
4			Jaluco1	19.2635278	-104.693583		
5			Jaluco2	19.26225	-104.688528		
6			Cascabeles	19.5019167	-104.567667		
7			AguaCaliente	19.5115556	-104.567028		
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							

Figura 48. Pestaña con las coordenadas geográficas de las poblaciones.

Después obtener una matriz con las distancias en kilómetros de la siguiente manera: Distance based - Distance - Geographic - Seleccionar la casilla con las columnas donde se encuentran las coordenadas, ej. Cols 3 & 4 = Cols C y D (X, Y coordinates), seleccionar la casilla “Decimal Lat/Long” (Data) - OK (Fig. 49).

La pestaña que se crea se llama GGD y con la pestaña PhiPTP se determinara el aislamiento por distancias mediante la prueba de mantel, siguiendo los pasos a continuacion: Distance based - Mantel - Paired - 999 permutaciones, worksheet names = pestaña GGD y PhiPTP - OK (Fig. 50).

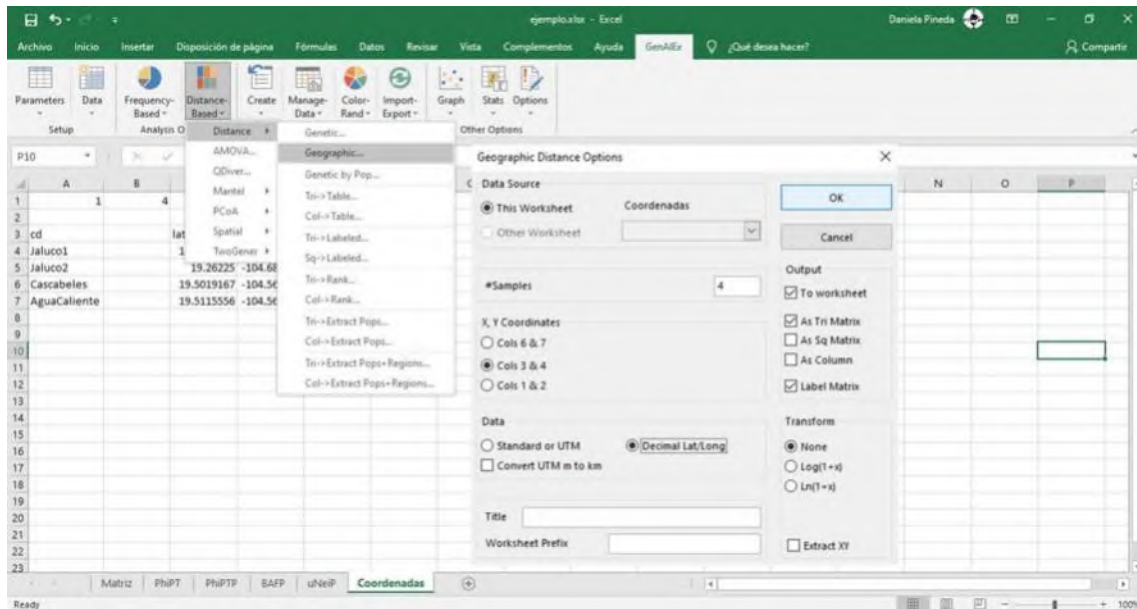


Figura 49. Pasos a seguir para la matriz de distancias en kilómetros.

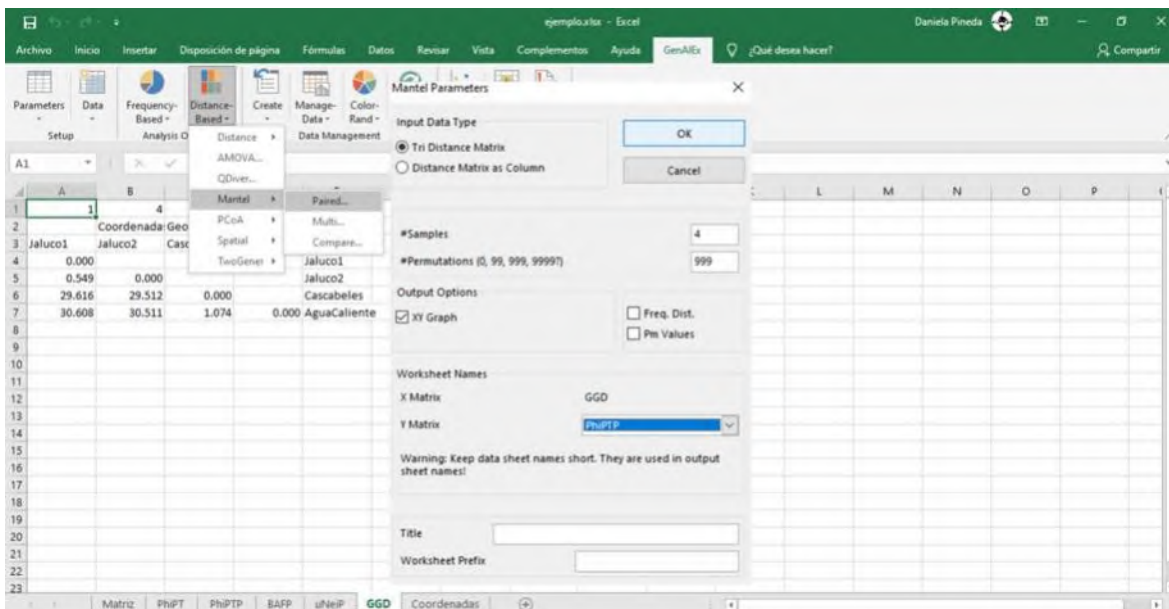


Figura 50. Pasos a seguir para la prueba de Mantel.

El nombre de la pestaña que se agrega es el conjunto de las matrices utilizadas (GGDvPhiPTP MT), para interpretar los resultados se analiza el resultado de P (Fig. 51), donde menor a 0.05 es significativo y se rechaza la hipótesis nula o mayor a 0.05 y se acepta la hipótesis nula, la cual indica que las matrices de distancia no están correlacionadas.

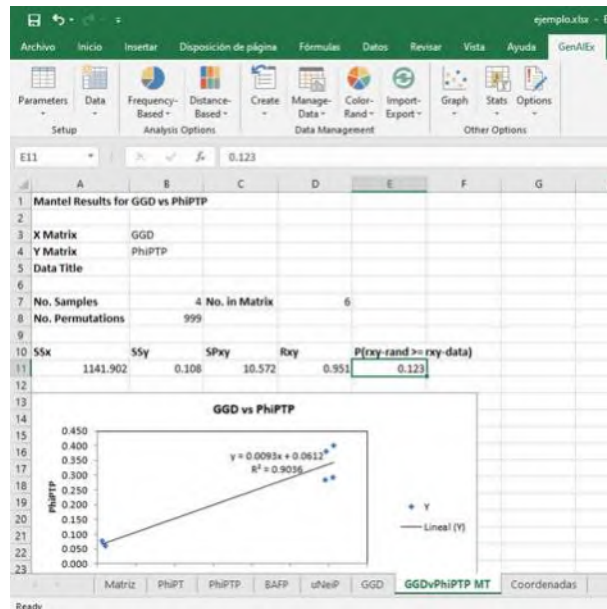


Figura 51. Resultados de la prueba de Mantel.

11.3. Análisis en PoppR

11.3.1. Matriz. tiene el mismo formato que la matriz para GenAlex, sin embargo, esta se guarda como archivo CVS (delimitado por comas) (Fig. 52).

Isolate	Population	GACA1	GACA2	GACA3	GACA4	GACA5	GACA6	GACA7	GACA8	GACA9	GACA10	GACA11	GACA12	GACA13	GACA14	GACA
J35	Jaluco1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J36	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J37	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J38	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
J39	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
J40	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J42	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
J43	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
J44	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	
J46	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J47	Jaluco1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
J48	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J49	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
J50	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J51	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J52	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J53	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
J55	Jaluco1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
J56	Jaluco2	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
J57	Jaluco2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	

Figura 52. Ejemplo de la matriz para hacer los análisis en PoppR.

11.3.2. Script. A continuación, se muestra el script con los comandos para hacer los análisis utilizando el paquete Poppr en R o Rstudio (Anteriormente mencionados, sección 11.1.1).

```
#Instalar paquetes necesarios (después de instalar una vez ya no es necesario hacerlo las siguientes veces, solo cargarlos).
install.packages("ade4")
install.packages("adegenet")
install.packages("poppr")

#Cargar los paquetes instalados
library(ade4)
library(adegenet)
library(poppr)

#Especificar el directorio de trabajo (ubicación de la matriz)
setwd("C:\\Users\\Usuario\\Documents\\Lav. Pat.
Veg\\Experimentos\\Jalisco\\análisis poblacional")
#Crear un objeto con el documento que se quiere leer (con el nombre dado a la matriz)
Colletotrichum <- read.genalex("Colletotrichum_5oligos_Poppr.csv", ploidy =
2, region = TRUE)
#Revisar objeto creado
Colletotrichum

#Crear matriz de genotipos multilocus
mlg.table(Colletotrichum, strata = NULL, sublist = "ALL", blacklist = NULL,
mlgsub = NULL, bar = TRUE, plot = TRUE, total = FALSE, color =
FALSE,
background = FALSE, quiet = FALSE)

#Funcion que analiza los datos y devuelve un cuadro con índices de
diversidad genética
poppr(Colletotrichum)

# Índice de asociacion para determinar el desequilibrio de ligamento
ia(Colletotrichum, sample = 999)
#Correccion de clones
corregida_All <- clonecorrect(Colletotrichum, strata = ~Pop/Region, combine
= FALSE, keep = 1)
ia(corregida_All, sample = 999)

#AMOVA
Amova_Colletotrichum<- poppr.amova(Colletotrichum, ~Region/Pop)
Amova_Colletotrichum
```

```

#Red de minima extensión
A.dist <- diss.dist(Colletotrichum)
adist <- diss.dist(Colletotrichum, percent = TRUE)
amsn <- poppr.msn(Colletotrichum, adist, showplot = FALSE, palette.colors(n=NULL, palette="Classic Tableau"))
# Graficar red
A.msn <- poppr.msn(Colletotrichum, A.dist, gadj = 19, size = 20, gscale = TRUE, wscale = TRUE, vertex.label = NA)
set.seed(1000)
plot_poppr_msn(Colletotrichum, amsn, gscale=TRUE,gadj=6,glim=c(0,0.8), gweight=1,inds=0,wscale=TRUE,nodescale=20)

```

11.3.3. Consola. Al abrir el programa R o RStudio, abrir un nuevo script y copiar los comandos de la sección 11.2.2 (Fig. 53). Después correr cada comando por separado.

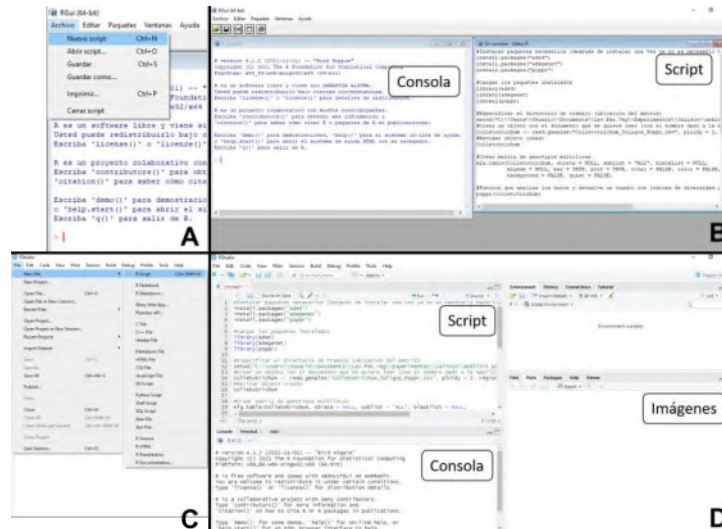


Figura 53. Ilustración de R y RStudio. A, pasos para crear un nuevo script en R; B, visualización de la consola y script en R (las imágenes se abren en una ventana nueva); C, pasos para crear un nuevo script en RStudio; D, visualización de la consola, el script y la ventana de imágenes en RStudio.

A continuación, se muestran los resultados que se observan en la consola después de ejecutar los comandos del script (las imágenes se despliegan en ventanas separadas, en los programas de R o RStudio). El patrón de colores se muestra como en RStudio: Azul-comandos, Rojo-mensajes de advertencia/Errores, Negro-información/Resultados (En R, Rojo-comandos, Azul- mensajes de

advertencia/Errores/Información/Resultados). Las imágenes se pueden descargar en formato pdf (Archivo - Guardar como - pdf). Los cuadros se pueden seleccionar - copiar - pegar en una hoja de Excel.

```
R version 4.1.2 (2021-11-01) -- "Bird Hippie"  
Copyright (C) 2021 The R Foundation for Statistical Computing  
Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)
```

R is free software and comes with ABSOLUTELY NO WARRANTY.
You are welcome to redistribute it under certain conditions.
Type 'license()' or 'licence()' for distribution details.

R is a collaborative project with many contributors.
Type 'contributors()' for more information and
'citation()' on how to cite R or R packages in publications.

Type 'demo()' for some demos, 'help()' for on-line help, or
'help.start()' for an HTML browser interface to help.
Type 'q()' to quit R.

```
> #Instalar paquetes necesarios (después de instalar una vez ya no es  
necesario hacerlo las siguientes veces, solo cargarlos).
```

```
> install.packages("ade4")
```

```
WARNING: Rtools is required to build R packages but is not currently  
installed. Please download and install the appropriate version of Rtools  
before proceeding:
```

```
https://cran.rstudio.com/bin/windows/Rtools/
```

```
Installing package into 'C:/Users/Usuario/Documents/R/win-library/4.1'  
(as 'lib' is unspecified)
```

```
trying URL 'https://cran.rstudio.com/bin/windows/contrib/4.1/ade4_1.7-  
18.zip'
```

```
Content type 'application/zip' length 5233888 bytes (5.0 MB)
```

```
downloaded 5.0 MB
```

```
package 'ade4' successfully unpacked and MD5 sums checked
```

```
The downloaded binary packages are in
```

```
  C:\Users\Usuario\AppData\Local\Temp\Rtmpsvlb29\downloaded_pac  
kages
```

```
> install.packages("adegenet")
```

```
WARNING: Rtools is required to build R packages but is not currently  
installed. Please download and install the appropriate version of Rtools  
before proceeding:
```

```
https://cran.rstudio.com/bin/windows/Rtools/
```

```
Installing package into 'C:/Users/Usuario/Documents/R/win-library/4.1'  
(as 'lib' is unspecified)
```

```
trying URL
'https://cran.rstudio.com/bin/windows/contrib/4.1/adegetnet_2.1.5.zip'
Content type 'application/zip' length 2801907 bytes (2.7 MB)
downloaded 2.7 MB
package 'adegetnet' successfully unpacked and MD5 sums checked
The downloaded binary packages are in
  C:\Users\Usuario\AppData\Local\Temp\Rtmpsvlb29\downloaded_packages
> install.packages("poppr")
WARNING: Rtools is required to build R packages but is not currently
installed. Please download and install the appropriate version of Rtools
before proceeding:
https://cran.rstudio.com/bin/windows/Rtools/
Installing package into 'C:/Users/Usuario/Documents/R/win-library/4.1'
(as 'lib' is unspecified)
trying URL 'https://cran.rstudio.com/bin/windows/contrib/4.1/poppr_2.9.3.zip'
Content type 'application/zip' length 2102281 bytes (2.0 MB)
downloaded 2.0 MB
package 'poppr' successfully unpacked and MD5 sums checked
The downloaded binary packages are in
  C:\Users\Usuario\AppData\Local\Temp\Rtmpsvlb29\downloaded_packages
> #Cargar los paquetes instalados
> library(ade4)
Warning message:
package 'ade4' was built under R version 4.1.3
> library(adegetnet)
  /// adegetnet 2.1.5 is loaded ////////////
  > overview: '?adegetnet'
  > tutorials/doc/questions: 'adegetnetWeb()'
  > bug reports/feature requests: adegetnetIssues()
Warning message:
package 'adegetnet' was built under R version 4.1.3
> library(poppr)
Registered S3 method overwritten by 'pegas':
  method      from
  print.amova ade4
This is poppr version 2.9.3. To get started, type package?poppr
OMP parallel support: available
Warning message:
package 'poppr' was built under R version 4.1.3
> #Especificar el directorio de trabajo (ubicación de la matriz)
> setwd("C:\\Users\\Usuario\\Documents\\Lav. Pat.
Veg\\Experimentos\\Jalisco\\análisis poblacional")
> #Crear un objeto con el documento que se quiere leer (con el nombre
dado a la matriz)
```

```
> Colletotrichum <- read.genalex("Colletotrichum_5oligos_Poppr.csv", ploidy
= 2, region = TRUE)
```

Warning message:

```
In df2genind(gena, ind.names = ind.vec, pop = pop.vec, ploidy = ploidy, :
non-polymorphic marker(s) deleted
```

```
> #Revisar objeto creado
```

```
> Colletotrichum
```

```
This is a genclone object
```

```
-----
Genotype information:
```

```
59 original multilocus genotypes
```

```
62 diploid individuals
```

```
82 dominant loci
```

```
Population information:
```

```
2 strata - Pop, Region
```

```
4 populations defined - Jaluco1, Jaluco2, Cascabeles, AguaCaliente
```

```
> #Crear matriz de genotipos multilocus
```

```
> mlg.table(Colletotrichum, strata = NULL, sublist = "ALL", blacklist = NULL,
```

```
+ mlgsub = NULL, bar = TRUE, plot = TRUE, total = FALSE, color =
FALSE,
```

```
+ background = FALSE, quiet = FALSE)
```

	MLG.1	MLG.2	MLG.3	MLG.4	MLG.5	MLG.6	MLG.7	MLG.8	MLG.9	MLG.10	MLG.11
Jaluco1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
Jaluco2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
Cascabeles	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AguaCaliente	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	MLG.12	MLG.13	MLG.14	MLG.15	MLG.16	MLG.17	MLG.18	MLG.19	MLG.20	MLG.21	
Jaluco1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	
Jaluco2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	
Cascabeles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AguaCaliente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MLG.22	MLG.23	MLG.24	MLG.25	MLG.26	MLG.27	MLG.28	MLG.29	MLG.30	MLG.31	
Jaluco1	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	
Jaluco2	1	1	2	1	0	0	0	1	1	1	
Cascabeles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AguaCaliente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	MLG.32	MLG.33	MLG.34	MLG.35	MLG.36	MLG.37	MLG.38	MLG.39	MLG.40	MLG.41	
Jaluco1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	
Jaluco2	0	1	2	1	0	1	0	0	0	0	
Cascabeles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
AguaCaliente	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	MLG.42	MLG.43	MLG.44	MLG.45	MLG.46	MLG.47	MLG.48	MLG.49	MLG.50	MLG.51	
Jaluco1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Jaluco2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cascabeles	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	
AguaCaliente	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	
	MLG.52	MLG.53	MLG.54	MLG.55	MLG.56	MLG.57	MLG.58	MLG.59			
Jaluco1	0	0	0	0	0	0	0	0			
Jaluco2	0	1	1	1	1	0	1	1			

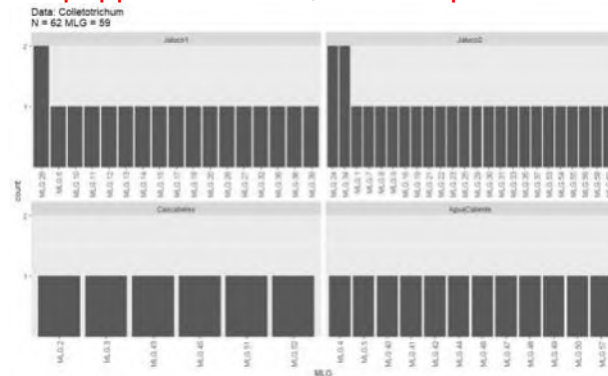
Cascabeles	1	0	0	0	0	0	0	0
AguaCaliente	0	0	0	0	0	1	0	0

Warning message:

In mlg.table(Colletotrichum, strata = NULL, sublist = "ALL", blacklist = NULL,

:

In poppr version 2.0, bar is deprecated. Please use plot.



> #Funcion que analiza los datos y devuelve un cuadro con índices de diversidad genética

> poppr(Colletotrichum)

| Jaluco1

| Jaluco2

| Cascabeles

| AguaCaliente

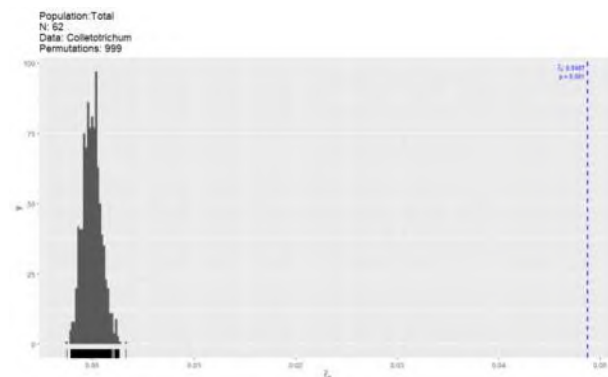
| Total

	Pop	N	MLG	eMLG	SE	H	G	lambda	E.5	Hexp	la	rbarD	File
1	Jaluco1	18	17	9.71	0.456	2.81	16.2	0.938	0.97	0.242	4.41	0.0837	Colletotrichum
2	Jaluco2	26	24	9.72	0.478	3.15	22.5	0.956	0.963	0.305	5.14	0.0684	Colletotrichum
3	Cascabeles	6	6	6	0	1.79	6	0.833	1	0.185	4.34	0.1448	Colletotrichum
4	AguaCaliente	12	12	10	0	2.48	12	0.917	1	0.216	5.31	0.1016	Colletotrichum
5	Total	62	59	9.93	0.262	4.06	56.5	0.982	0.975	0.319	3.74	0.0487	Colletotrichum

> # Índice de asociacion para determinar el desequilibrio de ligamento

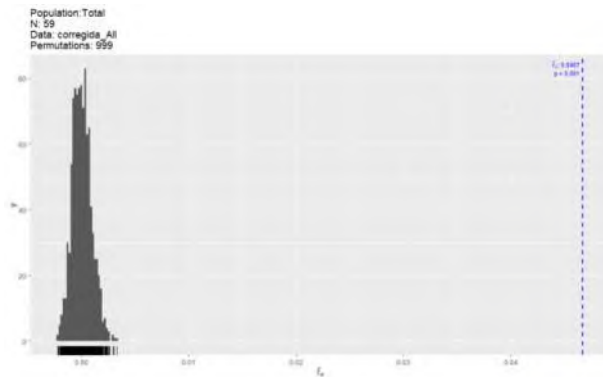
> ia(Colletotrichum, sample = 999)

la	p.la	rbarD	p.rD
3.73508308	0.001	0.04873256	0.001



> #Correccion de clones

```
> corregida_All <- clonecorrect(Colletotrichum, strata = ~Pop/Region,
combine = FALSE, keep = 1)
> ia(corregida_All, sample = 999)
la          p.la    rbarD      p.rD
3.58565307  0.001  0.04669006  0.001
```



```
> #AMOVA
> Amova_Colletotrichum<- poppr.amova(Colletotrichum, ~Region/Pop)
No missing values detected.
> Amova_Colletotrichum
$call
ade4::amova(samples = xtab, distances = xdist, structures = xstruct)
$results
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq
Between Region	1	137.98126	137.98126
Between samples Within Region	2	44.75019	22.3751
Within samples	58	616.04274	10.62143
Total	61	798.77419	13.09466

```
$componentsofcovariance
```

	Sigma	%
Variations Between Region	4.5545777	28.503432
Variations Between samples Within Region	0.8030458	5.025617
Variations Within samples	10.621427	66.470951
Total variations	15.97905	100

```
$statphi
```

	Phi
Phi-samples-total	0.3352905
Phi-samples-Region	0.0702917
Phi-Region-total	0.2850343

```
> #Red de minima extensión
> A.dist <- diss.dist(Colletotrichum)
> adist <- diss.dist(Colletotrichum, percent = TRUE)
> amsn <- poppr.msn(Colletotrichum, adist, showplot =
FALSE,palette.colors(n=NULL,palette="Classic Tableau"))
```

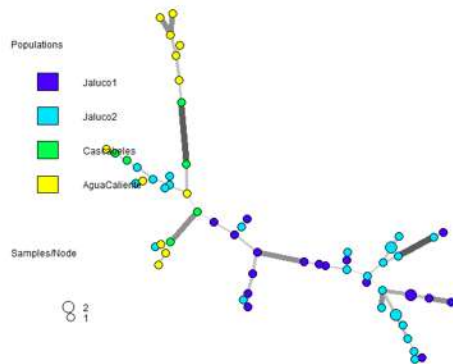
Warning message:

In palette_parser(palette, npop, pnames) :

Number of populations fewer than number of colors supplied. Discarding extra colors.

> # Graficar red

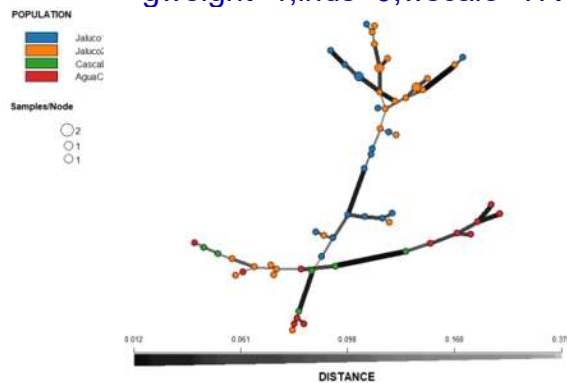
```
> A.msn <- poppr.msn(Colletotrichum, A.dist, gadj = 19, size = 20, gscale = TRUE, wscale = TRUE, vertex.label = NA)
```



```
> set.seed(1000)
```

```
> plot_poppr_msn(Colletotrichum, amsn, gscale=TRUE, gadj=6, glim=c(0,0.8),
```

```
+ gweight=1, inds=0, wscale=TRUE, nodescale=20)
```



11.4. Análisis en Structure

11.4.1. Matriz. Utilizar la misma matriz binaria con algunas modificaciones, eliminar las filas con las etiquetas y los datos generales de la matriz, cambiar los nombres de los aislados por números consecutivos y, también, numerar los sitios. Agregar columnas con “-9”, después de cada columna de las bandas de los oligonucleótidos. Por último, guardar en formato txt (Fig. 54). Descargar el programa structure (<https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure.html>).

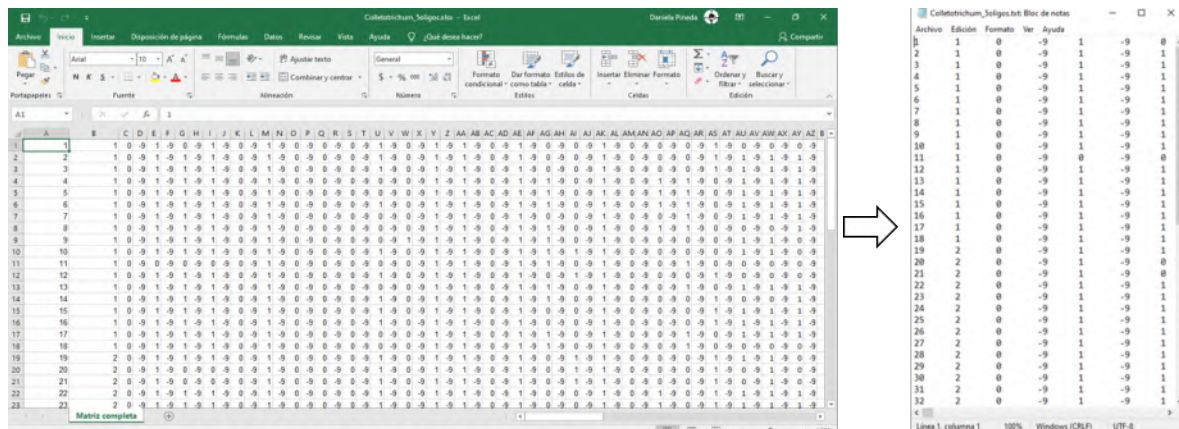


Figura 54. Ejemplo de la matriz para hacer los análisis en Structure y como se ve en formato txt.

11.4.2. Cargar documento. File - New Project - Step 1: ponerle nombre al proyecto, seleccionar el directorio (donde se va a guardar la información), seleccionar el archivo de texto - Next - Step2: agregar el número de individuos, el número de loci (cantidad de bandas en total), y el valor de los datos faltantes (-9, dato que se agregó a las columnas) - Next - Step 3: Seleccionar la casilla de “data file stores data from individuals in a single line” (Special format) - Next - Step 4: marcar las casillas de “individual ID for each individual” y “putative population origin for each individual” - Next - Confirmar que los datos estén correctos - Proceed (Fig. 55).

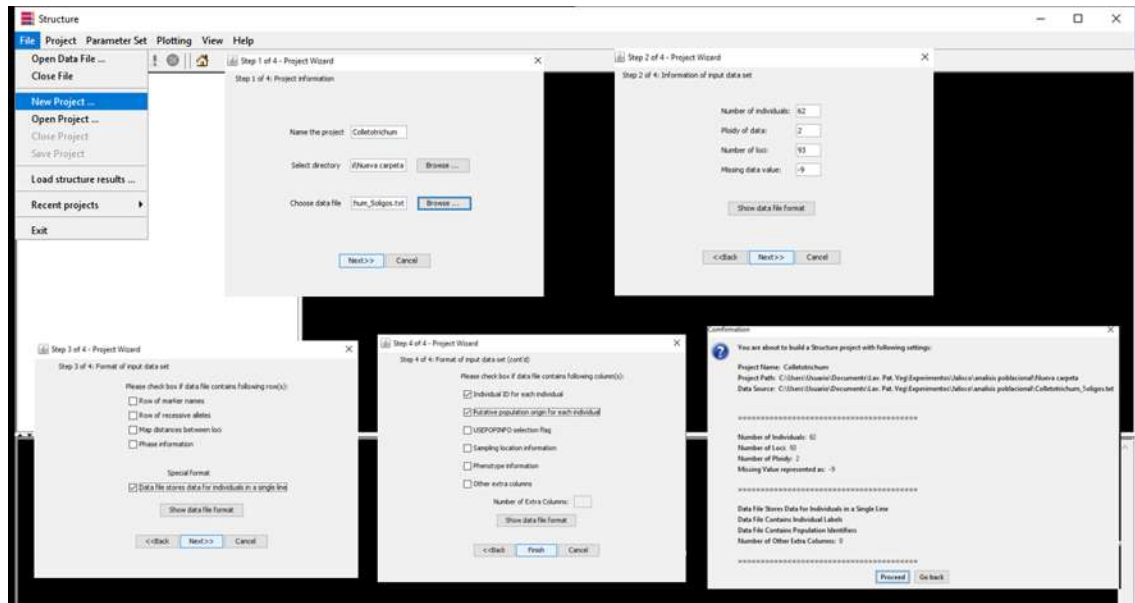


Figura 55. Pasos a seguir para cargar el archivo de la matriz en Structure.

11.4.3. Parámetros para el análisis. Parameter set - New - Burning Period (recomendado entre 15 y 20%) y el número de MCMC (recomendado entre 1 y 5 millones) - OK - nombrar los parámetros - aceptar (Fig. 56).

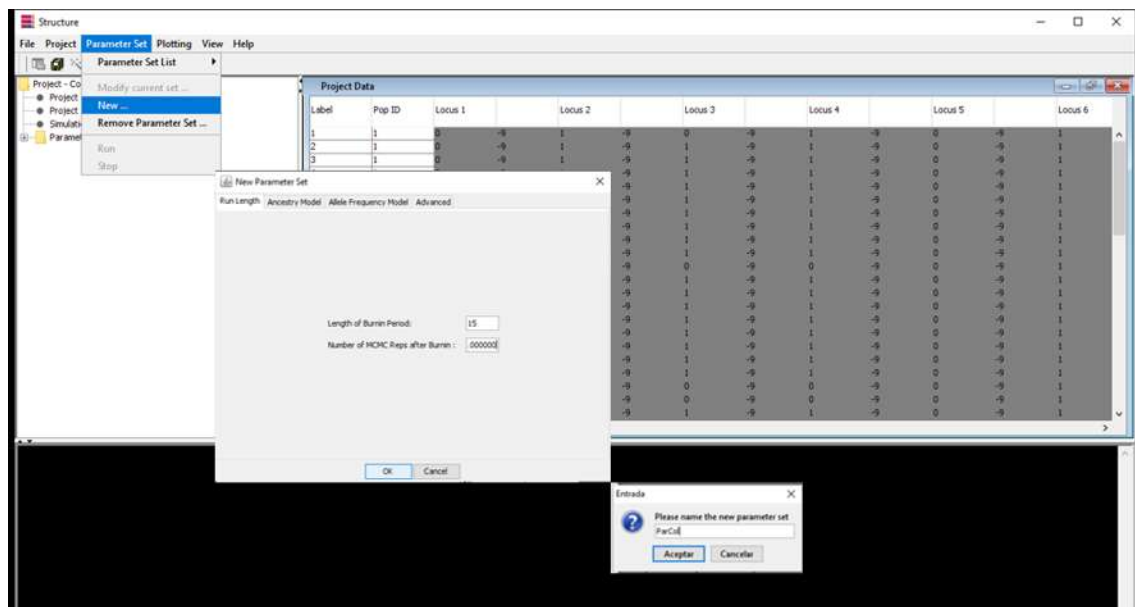


Figura 56. Pasos a seguir para establecer los parámetros que se utilizarán en el análisis.

11.4.4. Análisis de la estructura genética. Project - Start a Job - seleccionar parámetros, Set K from 1 to (número de sitios), numero de interacciones (recomendado 10, mínimo 3) - Start - OK (Fig. 57).

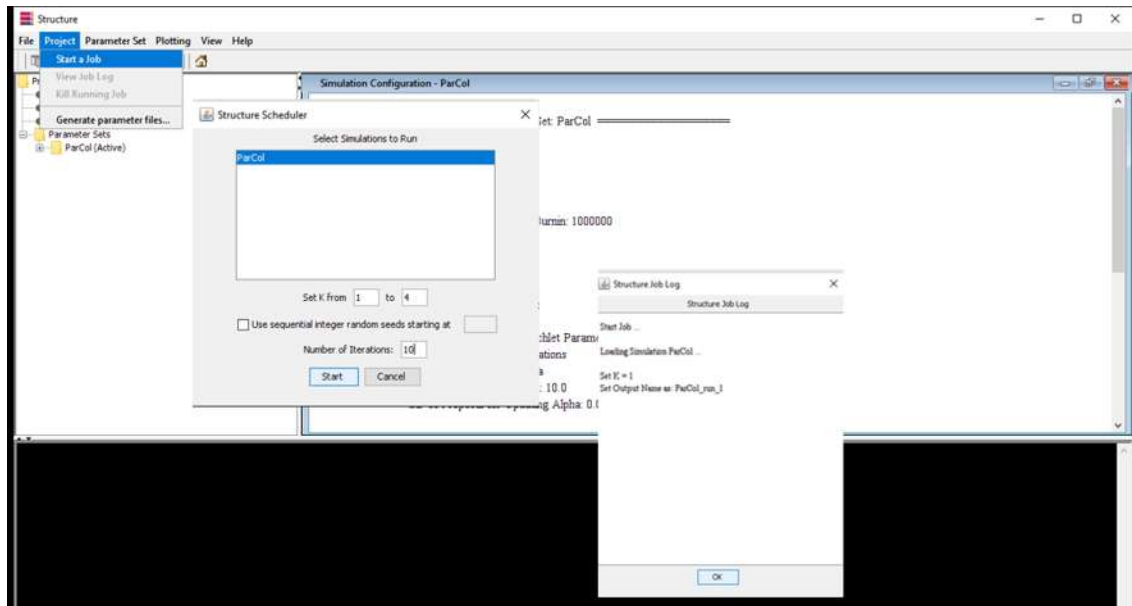


Figura 57. Pasos a seguir para realizar el análisis de la estructura genética de la población.

Después de que acaba el análisis, ir al directorio de trabajo donde se guardó una carpeta con el nombre del proyecto, dentro de esta carpeta hay otra carpeta con el nombre dado al set de parámetros, la cual contiene una carpeta con los resultados, comprimir esta última carpeta en formato zip (Fig. 58).

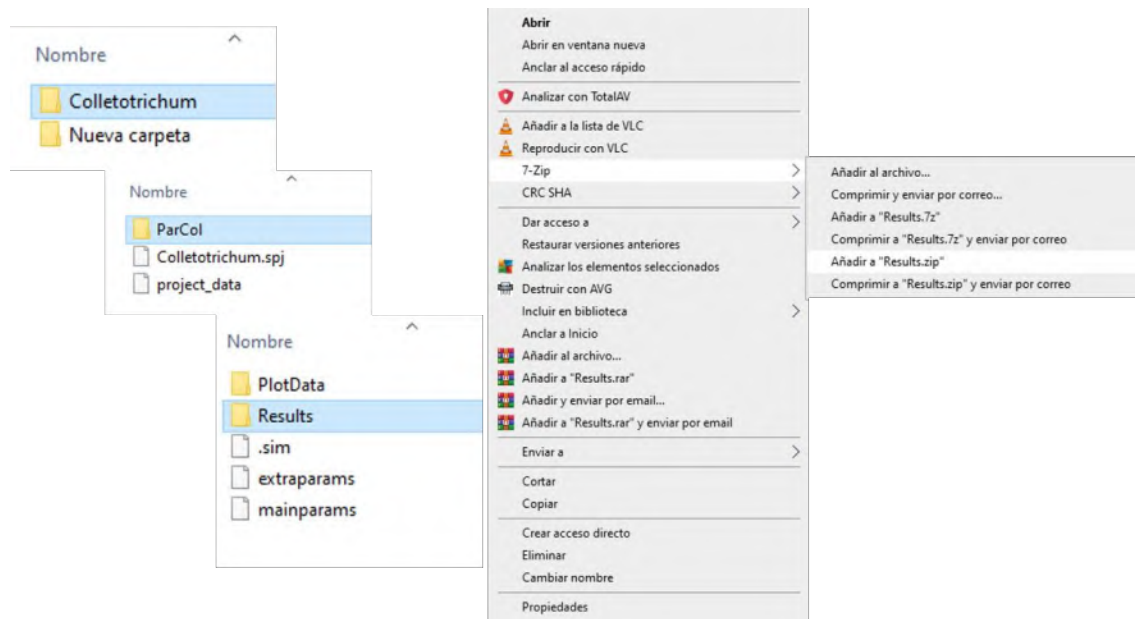


Figura 58. Seguimiento de la carpeta de resultados creada por Structure en el directorio de trabajo y pasos para comprimir a un archivo zip.

Para determinar cuál de los resultados es el apropiado para la población se utiliza el criterio de Evanno con el programa Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). Seleccionar el archivo comprimido (zip) - Harvest. En la página de resultados se muestran gráficas y después un Cuadro con los valores para identificar el número de grupos genéticos más probables entre los datos (determinado por el valor mayor de ΔK) (Fig. 59). Seleccionar una de las corridas que apoyan al número de grupos genéticos de la población, de acuerdo a su valor LnP (Est. Ln prob. of data) más bajo (Fig. 60).

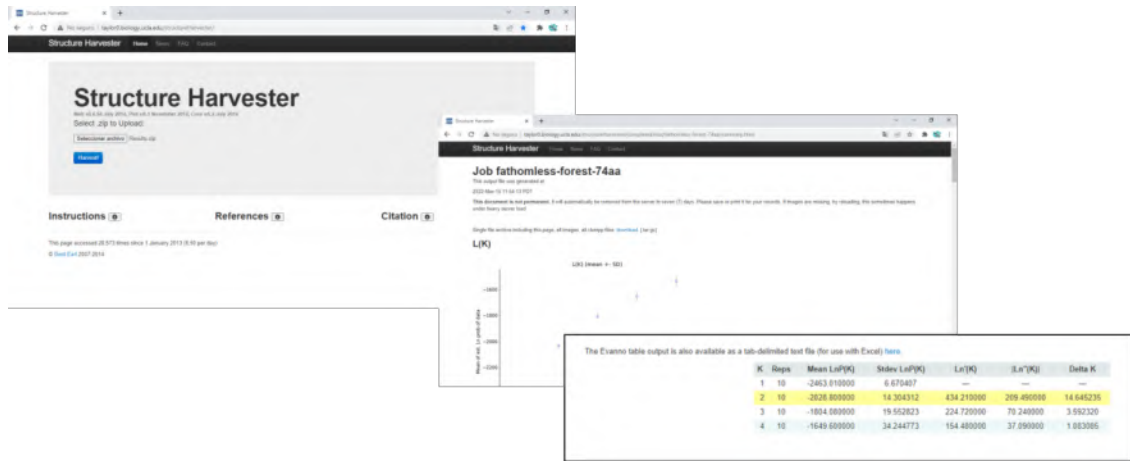


Figura 59. Análisis en la página de Structure Harvester y resultados con el cuadro con los valores para determinar el número de grupos genéticos más probable, remarcado en amarillo.

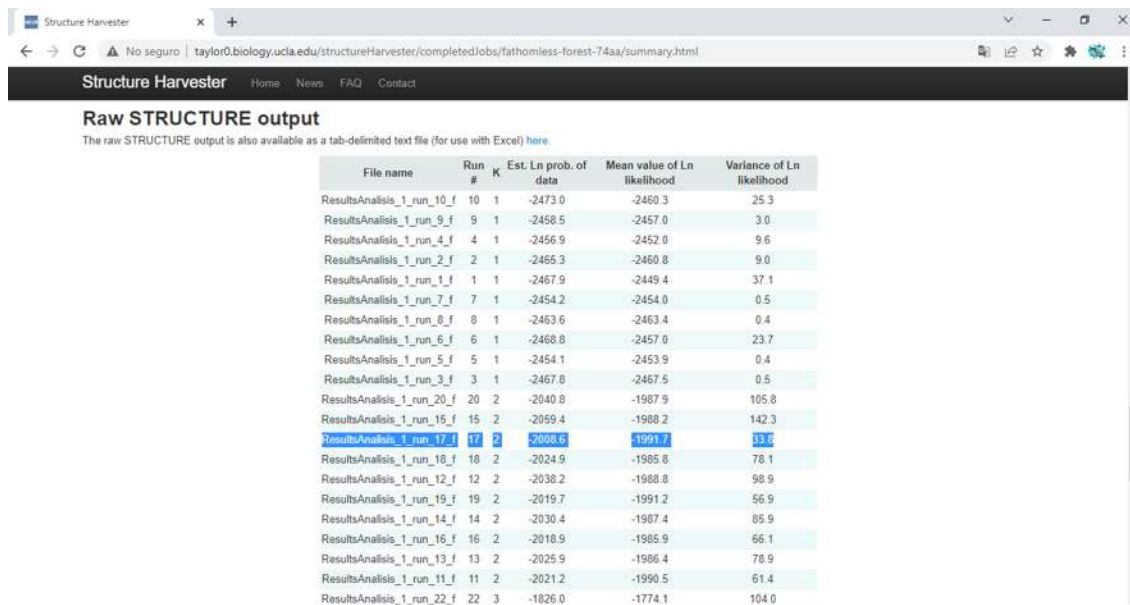


Figura 60. Resultados del análisis en la página de Structure Harvester del cuadro con los valores Ln de todas las corridas realizadas. Remarcado en azul, la corrida con el valor LnP (Est. Ln prob. of data) más bajo.

Volver al programa Structure, seleccionar la corrida determinada anteriormente, para graficar se puede utilizar la gráfica de barras por población dada por el programa o utilizar la Cuadro de la proporción de cada grupo para las poblaciones y realizar graficas de pasteles para colocar en un mapa en su posición geográfica aproximada (Fig. 61).

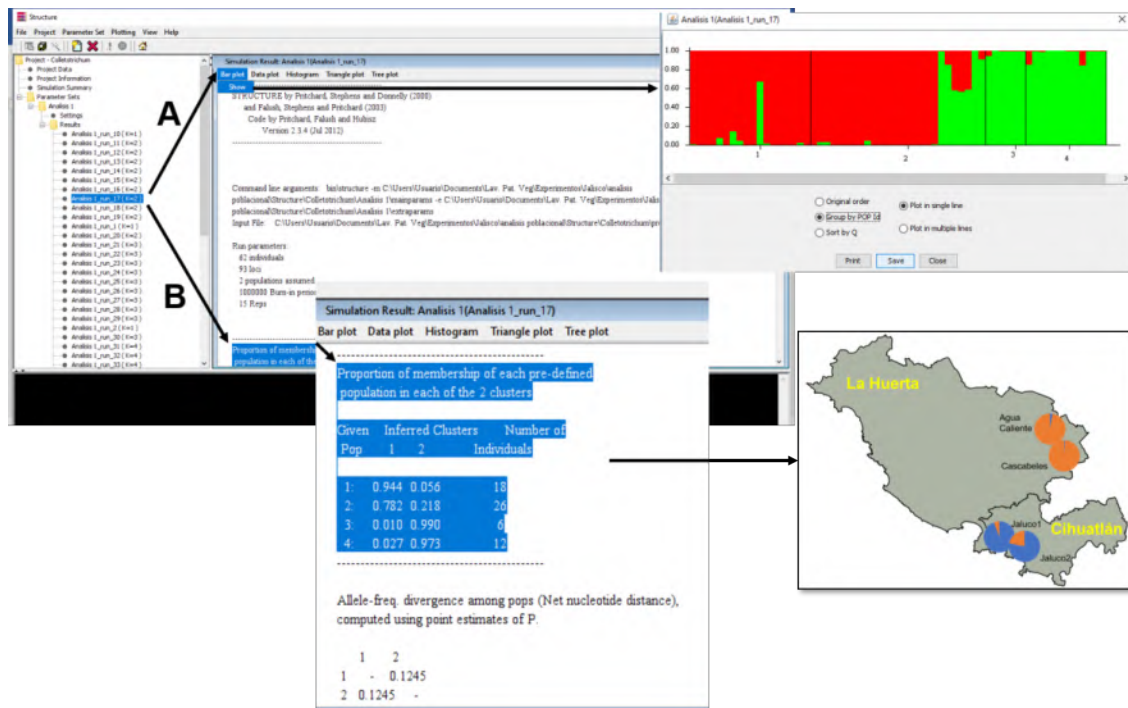


Figura 61. Opciones para graficar los resultados de la estructura de la población. A, Gráfico de barras dado por el programa; B, utilizar las proporciones de los grupos (remarcado en azul) para hacer graficas de pastel en Excel y colocarlas en su posición geográfica aproximada.