

## **ANTRACNOSIS: UNA INVESTIGACIÓN SOBRE SU AGENTE CAUSAL EN LA FRANJA AGUACATERA DE MICHOACÁN, MÉXICO**

H. Guillén-Andrade, M. Gutiérrez, M. B. N. Lara-Chávez, T. Chávez, A. Vidales-Fernández, S. Ochoa, y J. López-Medina.

Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Paseo Lázaro Cárdenas Esq. Con Berlín S/N Uruapan, Mich. CP 60190. Email: hguillenandrade@prodigy.net.mx

La enfermedad conocida como antracnosis se ha convertido en uno de los problemas de mayor importancia en el cultivo del aguacate (*Persea americana* Mill) en la franja aguacatera de Michoacán, México. Hasta ahora, se había señalado a *Colletotrichum gloeosporioides* como su agente causal. Se ha indicado que este fitopatógeno provoca diversos síntomas cuando infecta la cáscara y la pulpa del fruto; los síntomas típicos son: lesiones oscuras y hundidas, circulares o elipsoidales con grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosada. En el presente trabajo de investigación se hizo un análisis de 60 aislados de *Colletotrichum* a partir de frutos de aguacate colectados en 22 municipios de la franja aguacatera de Michoacán. Estos aislados fueron caracterizados utilizando tres diferentes criterios: los morfológicos, la sensibilidad a fungicidas y el análisis molecular en el nivel de ADN. Los resultados del análisis morfológico, incluyendo la forma y tamaño de los conidios, la velocidad de crecimiento y el color de la colonia, indicaron la presencia de dos especies: *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Los aislados que morfológicamente se ubicaron como *C. acutatum* dieron positivo para esta especie al hacer las pruebas de sensibilidad a benomil. Adicionalmente, los análisis de ADN hecho para los aislados identificados como *C. gloeosporioides* dieron positivo cuando se amplificó una muestra de ADN con el iniciador CgInt/ITS4 específico para esta especie, mientras que los identificados como *C. acutatum* dieron positivo cuando se utilizaron los iniciadores Calnt-2/ITS4, específicos para esta especie.

Palabras clave: aguacate, antracnosis, *Colletotrichum*, *gloeosporioides*, *acutatum*

## **ANTHRACNOSE: RESEARCH ON ITS CAUSING AGENT IN THE AVOCADO-PRODUCING AREA OF MICHOACAN, MEXICO**

H. Guillén-Andrade, M. Gutiérrez, M. B. N. Lara-Chávez, T. Chávez, A. Vidales-Fernández, S. Ochoa, and J. López-Medina.

Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Paseo Lázaro Cárdenas Esq. Con Berlín S/N Uruapan, Mich. CP 60190, Tel. 452 5 23 64 74. Email: hguillenandrade@prodigy.net.mx

Anthracnose has become one of the most important threats for avocado (*Persea americana* Mill) in the avocado-producing belt of Michoacan, Mexico. Former studies had identified *Colletotrichum gloeosporioides* as the pathogen species causing this disease, with typical symptoms including circular or ellipsoidal dark,

hidden lesions containing high amounts of salmon, orange, or pink compact masses of spores. In this research, 60 *Colletotrichum* isolates from avocado fruit were collected in 22 areas of the avocado-producing area of Michoacán. These isolates were analyzed and characterized by using three different criteria: morphological comparisons, fungicide sensitivity, and molecular (DNA) approaches. Morphological studies, which included form and size of conidia, growth rate and color of colony, indicated presence of two pathogen species: *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*. Benomyl sensitivity tests proved positive for isolates formerly identified as *C. acutatum* by morphological analysis. Moreover, DNA analyses conducted for isolates identified as *C. gloeosporioides* proved positive when a DNA sample was amplified with primer CgInt/ITS4 specific for this species, while those identified as *C. acutatum* proved positive when using primers Calnt-2/ITS4 specific for this species.

Key words: Avocado, anthracnose, *Colletotrichum*, *gloeosporioides*, *acutatum*

## I. INTRODUCCIÓN

Michoacán, México, es el principal productor de aguacate a nivel mundial y, por lo tanto, uno de los cultivos de mayor importancia por la generación de empleos directos e indirectos y por la introducción de divisas que genera (Ochoa y Ortega, 2002). Por las condiciones climáticas en que se desarrolla este cultivo en Michoacán, no esta exento de ser afectado por uno de los principales patógenos de plantas tropicales y subtropicales de todo el mundo, *Colletotrichum* y su teleomorfo *Glomerella*, causante de la antracnosis (Bailey, 1992, Prusky, *et al.*, 2000, Dodd, 1992.); en esta región, se ha reportado a la especie *C. gloeosporioides* causando diversos síntomas en aguacate, nombrándolos en conjunto como antracnosis: lesiones oscuras hundidas presentes en follaje, flor y fruto; varicela a lesiones circulares del fruto color café de tamaño menor a 0.5 mm; viruela o clavo, lesiones en fruto de aspecto corchoso, circulares y color café y marchitez de puntas de las ramas jóvenes (Morales, 1996, Campos, 2005 y Ochoa, 2005). En otros países como Nueva Zelanda (Hartill, 1991) y Australia (Coates, 1995) se ha identificado a *C. acutatum* asociado a antracnosis en este frutal. Debido a la diversidad de síntomas atribuidos a *C. gloeosporioides* y a las diferencias morfológicas determinadas entre algunas de las cepas colectadas, el presente trabajo de investigación se planteó con la finalidad de determinar la exclusividad de *C. gloeosporioides* como agente causal de los síntomas antes indicados.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 2.2. Área de estudio

El estudio se llevo a cabo en la franja aguacatera del estado de Michoacán, México que se localiza entre las coordenadas 19º 20' Latitud Norte y

101° 15' y 102° 30' de Longitud Oeste (INEGI, 1985) y que pertenece a la provincia fisiográfica del Sistema Volcánico Transversal (EDDISA, 2003).

### 2.3. Material biológico

Se utilizaron ocho cultivos monoconidiales de cepas de *Colletotrichum* sp., todas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las cepas fueron seleccionadas con base en las características morfológicas contrastantes presentadas en el medio de cultivo PDA como: color de micelio al anverso y reverso de la caja, consistencia del micelio (aéreo o raso), color del centro de la colonia, formación y color de masas conidiales. Tres de las cepas seleccionadas presentaron características de micelio gris al anverso y reverso y gris oscuro al centro de la colonia, consistencia algodonosa aérea, con masas conidiales color salmón y crecimiento rápido; todas estas características típicas de *C. gloeosporioides*. Las cinco cepas restantes presentaron micelio gris en el anverso y amarillo con ligero color rosado y con el centro verde olivo, con masas conidiales de salmón a naranja y crecimiento lento, características asociadas a *C. acutatum* (Sutton, 1992). El aislamiento del patógeno fue hecho a partir de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis, viruela o clavo y varicela provenientes de los municipios de Salvador Escalante, Peribán, Tancítaro, Tingüindín, Nuevo Parangaricutiro, Tingambato y Ario.

### 2.4. Caracterización de conidios

Los cultivos monoconidiales se establecieron en medio V8 agar, sin carbonato de calcio, para inducir mayor esporulación (Slade, 1987). Para la determinación del tamaño de los conidios se utilizó un microscopio óptico con campo de 43x, se midió la longitud y el diámetro. La forma de los conidios se determinó de acuerdo con Smith y Black (1990) y Sutton (1992), empleando un microscopio electrónico de barrido marca (x). El tamaño de muestra empleado fue de 100 conidios.

### 2.4. Sensibilidad a Benomilo

Para esta prueba se utilizó la técnica de transferencia en papel filtro (Dhingra y Sinclair, 1995). Se aplicó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la solución de cada tratamiento de benomilo ( $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $600 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Adaskaveg y Hartin, 1997) a discos de papel filtro. Posterior al secado, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de  $1 \times 10^5$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . Finalmente, los discos se colocaron en forma equidistante en la caja Petri con PDA. La sensibilidad fue medida como el diámetro de crecimiento de la cepa medido cada 24 h. La evaluación terminó cuando el tratamiento control (sin fungida) cubrió completamente el espacio de la caja Petri. La información generada fue analizada mediante un análisis de varianza y para la comparación de medias se utilizó la Prueba de Tukey. Para los

análisis descriptos se utilizó el procedimiento PROC ANOVA del paquete estadístico SAS (SAS, Institute, 1988).

## 2.5. Aislamiento de ADN

El micelio de cada una de las ocho cepas estudiadas fue crecido en medio líquido (Ristaino *et al.*, 1998). El ADN fue obtenido con el procedimiento CTAB (Henry, 1997, modificado por Guillén *et al.*, 2003). El ADN nuclear ribosomal (ADNnr) se amplificó utilizando los oligonucleótidos conservados ITS1 e ITS4, así como los oligonucleótidos ColF y ColR diseñados para distinguir aislados de *Colletotrichum* de otros hongos, incluyendo especies patogénicas comunes (Cano *et al.*, 2004). Para la amplificación diferencial de ADNnr de *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* se utilizaron las combinaciones específicas CgInt/ITS4 y Calnt-2/ITS4, respectivamente y de acuerdo a las condiciones descritas por Adaskaveg y Hartin (1998). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Techne TC-412 con el siguiente programa: 94 °C durante 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización (94 °C por 1 min; 50 °C por 1 min; 72 °C por 2 min) y 72 °C durante 10 minutos. Finalmente, los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa (1.2 %) y se tiñeron en Bromuro de Etidio (0.4 g mL<sup>-1</sup>), se observaron en un transiluminador de luz UV.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.2. Caracterización de conidios

Los resultados del análisis de forma y tamaño de conidios ratificaron la existencia de dos grupos: uno de ellos con conidios típicos de *C. gloeosporioides*, resenteroovoides y de formas cilíndrica con ápices obtusos con medidas de 12-17 µm de longitud y de diámetro. El segundo grupo, con características morfológicas de *C. acutatum* presentó conidios fusiformes típicos de esta especie, el tamaño varió dentro de longitud e 8.5-5.16.5 de diámetro.

### 3.3. Sensibilidad a Benomilo

La sensibilidad al fungicida benomilo es otro de los criterios (Adaskaveg y Hartin, 1997, Freeman *et al.*, 2000 y Talhinhos *et al.*, 2005) empleados para la distinción de *C. gloeosporioides* de *C. acutatum*. Los resultados del bioensayo de sensibilidad a benomilo indicaron una respuesta diferencial estadísticamente significativa y son consistentes en relación a los obtenidos en la caracterización morfológica incluidos los resultados de tamaño y forma de conidios. Las cepas caracterizadas como *C. gloeosporioides* mostraron una sensibilidad promedio de 38.5 %, 54.5 % y 56.5 % para las dosis de benomilo de 300 µg mL<sup>-1</sup>, 600 µg mL<sup>-1</sup> y 1200 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. De la misma manera, las cepas caracterizadas como *C. acutatum* presentaron una respuesta directamente proporcional a la dosis aplicada, pero en general, este grupo de cepas tuvo una

menor sensibilidad al fungicida benomilo: 22 %, 23.5 % y 25.5 % para las dosis de benomilo de 300, 600 y 1200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . En general, las cepas de *C. acutatum* mostraron una menor sensibilidad promedio; de 16.5 % y del 31 % para las dosis de 300 y 1200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con respecto a la observada en *C. gloeosporioides*. En la Figura 1, se observa la sensibilidad a benomilo de cada una de las cepas analizadas y de acuerdo a la dosis aplicada.

### 3.4. Análisis molecular

Al utilizar los iniciadores (CoIF/CoIR) para el género *Colletotrichum* se obtuvo un producto de amplificación cercano a 150 pb lo cual coincide con los tamaños (130 a 150 pb) reportados para estos iniciadores (Cano et al., 2004). Posteriormente, el ADN de los ocho aislados de *Colletotrichum* fue utilizado como blanco para reacciones de PCR con los iniciadores CgInt/ITS4, generados para amplificar un fragmento de aproximadamente 500 pb específicamente en el ADN de la especie *C. gloeosporioides* (Adaskaveg y Hartin, 1997). Los resultados obtenidos indicaron que con los iniciadores Calnt-2/ITS4, se generó un amplicón de 500 pb en tres de las cepas catalogadas como pertenecientes a la especie *acutatum*. De la misma manera, el ADN aislado de las cepas de la especie *gloeosporioides* generaron un producto de amplificación de 500 pb cuando fue amplificado con los iniciadores CgInt/ITS4. Estos patrones de amplificación son similares a los reportados para estas dos especies por Adaskaveg y Hartin (1997).

## IV. CONCLUSIONES

Las características morfológicas, de conidios, de sensibilidad a benomilo y las evidencias moleculares indican la presencia de *C. acutatum* relacionado con los síntomas de antracnosis atribuidos solamente a la especie *C. gloeosporioides* en aguacate en Michoacán, México.

## V. REFERENCIAS SELECTAS

- ADASKAVEG J. E., HARTIN R. J., 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* Isolates Causing Anthracnose of Almond and Peach in California. *Plant Pathology*, Vol. 87, No.9. p. 979- 987.
- CANO J., GUARRO J y GENE J., 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* 42(6):2450-2454.
- FREEMAN S. 2000. Genetic diversity and host Specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In *Colletotrichum Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*. Prusky D., Freeman S. and Dickman M. B. APS PRESS The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.
- HARTILL, W. F. T., EVERETT, K. R., 2002. Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots of 'Hass' avocado (*Persea*

americana). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. Vol. 30: 249–260

HARTILL, W. F. T. 1991. Post-harvest diseases of avocado fruits in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural. Science 19.

Suton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In Bailey, A. J. and Jeger, J.M. (Eds). *Colletotrichum* Biology, Pathology and control. British Society for plant pathology. C.A. B. International. 388 pp.

TALHINHAS, P., SREENIVASAPRASAD S., Neves-Martins and Oliveira H., 2005. Molecular and Phenotypic Analyses Reveal Association of Diverse *Colletotrichum acutatum* Groups and a Low Level of *C. gloeosporioides* with Olive Anthracnose. MICROBIOLOGY. Vol. 71, No. 6. pp. 2987–2998

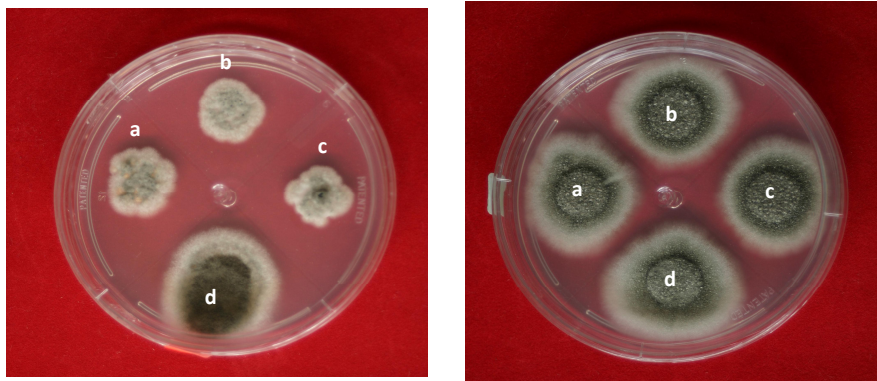


Figura 1. Respuesta de las cepas de *Colletotrichum* spp. a tres dosis de benomilo: a) 300 µg mL<sup>-1</sup>, b) 600 µg mL<sup>-1</sup>, c) 1200 µg mL<sup>-1</sup> y d) control.