

DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE DESARROLLO *IN VITRO* DE *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. EN AGUACATE “HASS”, EN LA ZONA AGUACATERA DE MICHOACÁN, MÉXICO

C. Reyes-Amado¹ y L. Morales-García²

1. Tesis de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH.

2. Profesor e investigador de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH. Paseo Lazaro Cárdenas Ezq Berlin s/n. Uruapan, Michoacán, México

Jluciano@prodigy.net.mx

El cultivo del aguacate prospera en diversas condiciones ecológicas del mundo. México ocupa el primer lugar como productor, en 1998 aportó el 69.2 % con un estimado de 2.3 millones de toneladas. Dentro de los problemas que afectan la producción de Aguacate destacan las enfermedades que se presentan en el fruto, como la Antracnosis, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, misma que provoca grandes pérdidas ya que lo afecta en cualquier etapa de desarrollo, traslado, almacenaje y comercialización. El presente trabajo tuvo el objetivo de determinar la temperatura *in vitro* de desarrollo del hongo *C. gloeosporioides* para lo cual se sometió a las siguientes temperaturas: 8 °, 14, 17, 21, 24, 28, 32, y 36 °C. Obteniéndose que a 8 °C *C. gloeosporioides* no creció, pero tampoco murió, teniendo que la temperatura óptima de desarrollo fue de 21 °, 24, 28 °C ya que el llenado de la caja petri ocurrió en menos tiempo, seguido de 32 °, 17 y 14 °C. A 36 °C donde se tuvo un crecimiento muy lento. Se aisló a *Colletotrichum* para inocular frutos sanos y se logró tener las manchas oscuras con masa de esporas de color rosado a los 16 días de la inoculación

TEMPERATURE DETERMINATION FOR OPTIMUM *IN VITRO* GROWTH OF *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. COLLECTED FROM ‘HASS’ AVOCADO IN MICHOACAN, MEXICO

C. Reyes-Amado¹ and L. Morales-García²

1. Tesis de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH.

2. Profesor e investigador de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” UMSNH. Paseo Lazaro Cárdenas Ezq Berlin s/n. Uruapan, Michoacán, México

Jluciano@prodigy.net.mx

Avocado thrives under diverse ecological conditions, being Mexico the world's top producer of this crop. In 1998, Mexico alone contributed with 69.2% of avocado world production, with a total estimate of 2.3 million tons. Among the several threats avocado faces, fruit diseases are to be considered. One of these diseases is anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, which attacks fruit at any development stage up to storage and commercialization stages. The objective of this research was to determine optimum temperature for growth of *C. gloeosporioides* under *in vitro* conditions. *C. gloeosporioides* was exposed to 8°, 14°, 17°, 21°, 24°, 28°, 32°, and 36 °C. At 8 °C, *C. gloeosporioides* did not grow, but it did not die, either. Optimum and fastest growth of *C. gloeosporioides* was observed at 21°, 24, and 28°C, followed by 32°, 17°, and 14°C; slowest growth was observed at 36 °C. *C. gloeosporioides* was isolated in order to inoculate healthy avocado fruits; dark spots of pink-like spores were observed

on fruit 16 days after inoculation.

INTRODUCCIÓN. El cultivo del aguacate prospera en diversas condiciones ecológicas del mundo. México ocupa el primer lugar como productor de aguacate a nivel mundial con una aportación de 62 %. La superficie cosechada en México es de 100,000 has. Con una producción total estimada de 1'100,000 ton (Ochoa, 2002) de los cuales el 85 % son cosechadas en Michoacán; en los municipios de Uruapan, Tancítaro, Peribán, Tacambaro, Ario de Rosales, Salvador Escalante, Nvo. Parangaricutiro, Tingüindin, los Reyes, Tingambato, Ziracuaretiro, de lo cosechado, el 93 % se comercializa en el país y el resto en mercados internacionales, principalmente en Europa, Canadá, Japón y Estados Unidos (Morales y Ávila, 2002). Este cultivo tiene además una gran importancia social, se generan alrededor de 40,000 empleos directos y permanentes, 25,000 empleos entre directos y estacionales y 60,000 estacionales por diversas actividades derivadas del proceso de la cadena productiva. Michoacán produce en promedio de 10 a 12 ton/ha., su potencial es de 20 a 30 ton/ha y sólo el 20 % de la producción reúne las características de calidad de exportación (Gutiérrez, 2004).

La expansión de este frutal en la región lo ha convertido en un monocultivo, situación que genera diversos problemas, entre ellos sobresale el alto costo de control fitosanitario. Hasta el momento, han sido detectados 25 microorganismos causantes de enfermedades, entre las que destacan las que atacan al sistema radicalr (Morales y Ávila, 2002). La Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, es considerada una de las principales enfermedades debido a que su principal daño es directamente al fruto, aunque se puede presentar en cualquier estado de desarrollo de la planta causando caída prematura de frutos o pérdida de calidad comercial de estos, afectando la fotosíntesis y otras funciones fisiológicas e incluso, puede permanecer como infección latente y causar daños en postcosecha (Gutiérrez, 2004).

Los factores ambientales que favorecen el desarrollo de los hongos son la temperatura, humedad relativa, lluvia, radiación solar, intensidad lumínica y viento, de los cuales los factores climáticos que influyen directamente en la liberación y dispersión de las esporas así como la severidad de los hongos son la temperatura y la lluvia. Por lo tanto es importante mediante el cultivo *in vitro* realizar un bioensayo que permita determinar la temperatura en la que se desarrollan mejor los patógenos que permitirá un manejo adecuado reduciendo el número de aspersiones y la cantidad de agroquímicos así como los daños ecológicos.

OBJETIVOS: Determinar la temperatura óptima de desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro*.

HIPÓTESIS: Es posible mediante el cultivo *in vitro*, calcular las diferentes temperaturas en las que *Colletotrichum gloeosporioides* se desarrollan, bajo condiciones de laboratorio.

REVISIÓN DE LITERATURA. Debido a las condiciones presentes en la región productora del estado de Michoacán el cultivo del aguacate presenta problemas que limitan la producción y comercialización tales como: mal manejo de podas, malos riegos, aspersiones inadecuadas, daños de plagas y enfermedades en pre y postcosecha, poca organización entre los productores para la comercialización, introducción al mercado de fruta chica, así como el corte antes de su madurez fisiológica (Ortiz, 1998).

Las enfermedades que atacan al aguacate afectan la producción en un 40 % y ocupan un renglón importante por el número, intensidad y como factor que incrementa costos de producción, ya que se requiere de 6 a 7 aplicaciones de pesticidas para su control acompañado por prácticas culturales y de manejo. De las enfermedades que se consideran de importancia económica por afectar la calidad y la cantidad de la cosecha, se encuentra la Antracnosis, Roña, Anillamiento del pedúnculo, Tristeza del Aguacate y las enfermedades de postcosecha (Vidales, 1994, Morales 1997 y Kido 1997. Citado por Ortiz, 1998).

C. gloeosporioides es una enfermedad endémica muy importante que se presenta regularmente cada año, demerita la apariencia del fruto y causa problemas en su comercialización. Además, eleva los costos de cultivo por la demanda de control de la enfermedad y causa grandes pérdidas en los embarques destinados a mercados nacionales e internacionales. La enfermedad se ha observado con alta incidencia en todos los municipios de Michoacán sobre el cv. Hass, el hongo infecta a frutos, durante el desarrollo en el campo, permaneciendo latente mientras el fruto tenga una consistencia dura. Una vez que el fruto inicia su ablandamiento el hongo invade la cáscara y la pulpa causando su pudrición (Morales, 2002).

Se encuentra distribuida en todos los municipios de Michoacán donde se cultiva el aguacate, también ocurre en los estados de México, Puebla, Morelos y Guanajuato. Su principal daño es en el huerto, transporte, almacén o en el mercado. La humedad relativa de 85-90 %, temperatura de 18-25 °C en campo y la falta de aireación en los huertos favorece la infección. El hongo sobrevive en brotes tiernos, frutos momificados, ramas y hojas afectadas. La infección más severa se presenta durante los meses de junio, julio y agosto que es cuando se presenta la época de lluvias y en menor grado en febrero y marzo cuando se presentan las lluvias llamadas “cabañuelas”.

Los municipios con mayor incidencia de la enfermedad son Tacambaro 74 %, Tingüindin 67 %, Uruapan 57 %, Peribán 50 % y Zitácuaro 42%. La mayor incidencia de la enfermedad presente en Tacambaro podría deberse a la mayor humedad relativa presente en este municipio, en contraste con Zitácuaro el cual presenta menor humedad relativa (Morales, 1997). La Antracnosis, viruela, clavo, sarampión, Marchitez de puntas, tizón floral son causadas por *C. gloeosporioides* cuyo teleomorfa es *Glomerella cingulata*. Se encuentra distribuida en todos los municipios donde se cultiva aguacate en el estado de Michoacán, los daños se presentan desde la formación de frutos, durante su desarrollo en el árbol, en el traslado, almacenaje y comercialización. En la actualidad esta enfermedad es la que requiere mayor número de aplicaciones de

pesticidas para su control y en algunas localidades afecta la producción hasta un 64 % (Morales, 1997).

Lesiones oscuras y hundidas, circulares o angulares con presencia de masas de esporas de color rosado. Este hongo causa daños en diferentes fases de desarrollo de la planta daña las inflorescencias y causa la caída prematura de frutos, afecta la fotosíntesis y altera otras funciones fisiológicas de la planta, permanece en infecciones latentes y causa daños en postcosecha (Morales, 1997). *C. gloeosporioides* ataca a diferentes partes de la planta. En hojas se manifiesta como pequeñas manchas de color café claro observándose más grandes cuando se juntan (Morales, 1997). En ramas tiernas se observan abultamientos con presencia de savia de color blanco alrededor de la misma, a este síntoma se le conoce regionalmente como sarampión, en ocasiones llega a secar las partes afectadas, que generalmente son las puntas, llamándose Marchitez de punta (Morales, 1997). Cuando ataca a las flores aparece como tizón, originando la caída de estas o el aborto de los frutos en los cuales se observan pequeñas protuberancias de color verde brillante, que se presenta en cualquier etapa de desarrollo del fruto, aunque la incidencia de la enfermedad es más alto cuando el fruto es más pequeño, las lesiones son circulares y café claro, tornándose posteriormente café a negro claro y de consistencia corchosa conocida como viruela o clavo (Morales, 1997). Cuando las condiciones son favorables hay esporulación sobre las lesiones las cuales adquieren en color rosa o salmón debido a la gran cantidad de esporas. El hongo penetra a la pulpa y causa una pudrición firme (Morales, 1997). El patógeno en campo inverna formando su fase sexual con peritecios acompañados en frutos como de ramas muertas. En su fase asexual puede permanecer como micelio establecido en lesiones frescas (Castro, 2004).

El hongo inverna en tallos, hojas y frutos enfermos de las plantas en forma de micelio o espora. Cuando se forman las ascosporas en frutos momificados, producen infecciones primarias en primavera, pero casi éstas no son necesarias. El micelio superviviente rápidamente produce conidios, los cuales producen infecciones primarias y subsecuentemente infecciones secundarias. La infección del hongo se lleva a efecto mediante la penetración directa a los tejidos sanos, donde el micelio crece intercelularmente y puede permanecer latente durante cierto tiempo antes de que las células empiecen a colapsarse y pudrirse. El micelio del hongo produce entonces acérvulos y conidios inmediatamente por debajo de la cutícula, la cual se rompe y libera los conidios para una vez más iniciar infecciones (Agrios, 1985).

Factores ambientales que favorecen el desarrollo de hongos son: la temperatura, humedad, luz, nutrientes y el pH del suelo. Sus efectos en las enfermedades son el resultado de su influencia sobre el desarrollo y la susceptibilidad del hospedero, sobre propagación y actividad el patógeno o sobre la interacción entre ambos y de su efecto sobre el desarrollo de los síntomas de la enfermedad (Gutiérrez, 2004).

Se determino que la temperatura base de crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* fue de 8 a 24 °C; en estas condiciones, los cultivos monoconidiales lograron su máximo crecimiento en el menor tiempo. En campo no se presentaron lesiones nuevas en frutos cuando la temperatura media fue inferior a los 14°C, de igual forma cuando fue mayor

de 18.9°C. A temperaturas medias mayores de 15° C el número de lesiones aumento y entre 15.4°C y 17.9°C se presentó el mayor numero de lesiones (Morales, 2000).

El desarrollo *in vitro* de *C. gloeosporioides* en temperatura de 8 ° a 30 °C explica en parte la presencia de este hongo en la mayoría de los huertos ubicados en las diferentes áreas de las zonas aguacateras de Michoacán, incluso en huertos en donde la temperatura llega a ser inferior a 4 °C en las épocas frías del año y en aquellos donde se puede alcanzar temperaturas máximas cercanas a los 30 °C. La capacidad que manifiesta este hongo para crecer y sobrevivir en una amplia variación de temperatura explica en parte que la enfermedad sea endémica en el estado de Michoacán (Morales, 2000).

La reproducción sexual que da origen a unas estructuras denominadas peritecios producidas en ascosporas causantes de las infecciones primarias, de esta forma es llamada *Glomerella cingulata* la cual se presenta una vez al año cuando las condiciones ambientales como temperaturas altas (29 °C), la humedad relativa es baja (+ ó – 40 %), dichas condiciones ocurren entre los meses de Marzo a Mayo (Ochoa y Santacruz, 2001). La reproducción asexual a la que también se conoce como fase imperfecta o conidial presenta las estructuras denominadas acervulos, los que a su vez producen las estructuras llamadas conidios que son los encargados de las infecciones secundarias las cuales son muy frecuentes bajo condiciones de alta humedad y temperatura que oscilen entre 25 y 29°C y puede repetirse su reproducción cada veinte días durante el período de lluvias (Junio a Octubre) (Ochoa y Santacruz, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS. El experimento se desarrollo en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” dependiente de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ubicado en Uruapan, Michoacán.

Frutos de aguacate con síntomas de Antracnosis colectados en el huerto denominado “La cruz” de la comunidad de San Lorenzo, ubicado al Noroeste del municipio de Uruapan aproximadamente en el paralelo 19° 30´ 30” de longitud Norte y 102° 06´ 40” de longitud Oeste, con respecto al meridiano de Greenwich. Con una altura de 2100 msnm, suelo de origen volcánico, arenoso-barroso semifértil, con temperatura fría, lluvias en verano, remolinos de tierra en Febrero a Mayo, precipitación media anual de 1630 mm.

Se procedió a la siembra del material colectado, cada muestra fue lavada con agua y jabón para eliminar restos indeseables, se seleccionó el tejido dañado y con la ayuda de navaja y aguja de disección, se cortó la cáscara o el pericarpio en trozos de 2 mm de longitud; posteriormente se desinfectó cada muestra con hipoclorito de sodio al 2 % durante dos minutos, fueron enjuagados con agua destilada estéril tres veces para eliminar la presencia de cloro en los tejidos y se secaron con papel filtro estéril para evitar excesos de agua. En cajas Petri que contenían medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa- Agar) se depositaron cinco muestras dispuestas en cinco de oros bajo condiciones asépticas, las cajas fueron selladas individualmente con papel Kleen pack, se etiquetaron y colocaron en una incubadora a temperatura media de 20 °C.

Después de 3 a 4 días de la siembra de las muestras colectadas, las cajas presentaban un desarrollo de colonias fungosas correspondientes a cada muestra, se hizo una purificación sacando una porción del micelio en desarrollo dentro de la caja Petri y se colocó en otra con medio fresco con el objeto de mantener la pureza del mismo.

Una vez que se obtuvieron las colonias puras, se procedió a su identificación se realizaron preparaciones fijas del micelio obtenidas de las cepas puras, en lactofenol azul para su observación en el microscopio compuesto. Para montar las preparaciones fijas se colocó una gota de lactofenol azul en el centro de un portaobjetos completamente limpio, depositando en está una muestra de micelio extraído bajo condiciones asépticas de una caja Petri invadida totalmente por el hongo causante de la Antracnosis, se cubrió la preparación con cubreobjetos, ayudándose con una aguja de disección para evitar la formación de burbujas; cubiertas las muestras se sellaron con barniz de uñas transparente y se procedió a la identificación realizando comparaciones con las claves de (Barnett 1972 y Frezzi 1950).

Se evaluó la temperatura óptima de crecimiento *in Vitro*. En cajas que contenían PDA se sembraron discos de 5 mm de diámetro extraídos de cepas puras, se colocaron en el centro de la caja Petri, cada caja se sello con papel Kleen pack, se etiquetó y se sometió a diferentes temperaturas; 8, 14, 17, 21, 24, 28, 32 y 36 °C; se realizaron cinco repeticiones para cada temperatura, se utilizó un diseño experimental completamente al azar, la unidad experimental fue una caja Petri; los patógenos que fueron sometidos a 21, 24, 28, 32 y 36 °C se mantuvieron en incubación hasta que el hongo llenara la caja Petri. Las muestras sometidos a temperaturas mas bajas 8, 12, 14 y 17 °C se mantuvieron en refrigerador. Para la evaluación del efecto temperatura/ crecimiento, se midió el desarrollo del hongo con un vernier por medio de registro diario dado en cm, hasta el llenado de la caja Petri.

Con el propósito de confirmar que el patógeno aislado era el agente causal de los síntomas de Antracnosis observado en campo, se procedió a realizar inoculaciones en frutos sanos de los patógenos previamente cultivados *in vitro*, procurando que fuera aislamiento reciente con el objeto de no perder la patogenicidad, para lo cual se utilizaron dos cajas Petri con abundante esporulación del hongo por cada fruto, vertiendo agua destilada estéril sobre la caja Petri se raspo suavemente con una asa bacteriológica sobre el micelio para desprender las esporas del medio de cultivo después, se pasó a través de manta cielo para permitir solo el paso de esporas y así tener una solución de esporas.

La concentración de esporas de *C. gloeosporioides* se determinó colocando alícuotas de la suspensión en un hematocitometro y con la ayuda de un microscopio óptica a 40x, se realizo el conteo de esporas. Se hizo utilizando un hematocitometro A.O que esta formado por dos áreas de conteo de vidrio pulido sobre las cuales están grabados nueve cuadrados y el cuadro del centro esta dividido a su vez en cuadros más pequeños. Debido a que los propángulos (conidios) son pequeños se hicieron conteos en una fracción del cuadro principal (centro) de la cámara de conteo; se contaron los conidios en un número reducido de los cuadros secundarios (se observaron los cuatro

cuadrados secundarios esquinados y el centro y la suma, se multiplico por 50 dando como resultado el número/cm³). Obteniendo un promedio de 147,500 esporas/cm³.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN. El aislamiento del hongo causante de la Antracnosis en frutos de aguacate se logró en cultivos de PDA a partir de frutos infectados colectados en huertos de aguacate. Los patógenos fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio. El hongo presenta micelio de color blanco grisáceo oscuro, aéreo liso, conidios formados en masas de color salmón cilíndrico o elíptico redondeados en su parte terminal, lo que coincide con Morales (2000), quien menciona que las colonias de *C. gloeosporioides* son variables. (Fig.1)

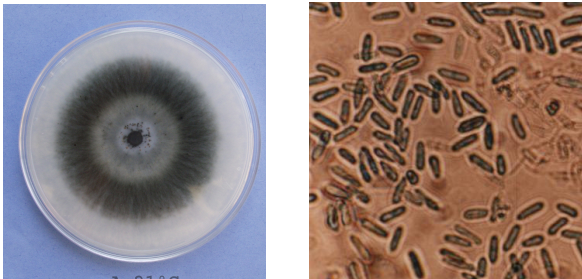


Figura 1. Desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* **A.** Caja Petri con micelio **B.** Tipos de esporas del patógeno.

De acuerdo con las pruebas de patogenicidad realizadas en aguacate éstos presentaron los síntomas que caracterizan la enfermedad a los 16 días de ser inoculados. Presentaron manchas o lesiones oscuras circulares con grandes de esporas formando masas compactas de color salmón a naranja. Morales (1997). Pudo aislarse nuevamente el patógeno para comprobar así, que *C. gloeosporioides* es el agente causal de la Antracnosis en frutos de aguacate.

Desarrollo de *C. gloeosporioides*. En tratamientos de temperatura de 21 °C, 24 y 28 °C, el patógeno se desarrollo de manera semejante, su crecimiento fue el mejor por lograr el llenado de la caja Petri a los 8 días, el resultado concuerda con lo obtenido por Morales (2000), quien menciona que la temperatura óptima para su desarrollo fue de 24 °C, uno de los cinco monoconidiales cubrió la caja, lo cual sucedió a los nueve días.

El crecimiento de *C. gloeosporioides*, se vio afectada cuando se incubó en tratamientos con temperatura de 8° y 36 °C ya que el patógeno no creció a estas temperaturas, sin embargo se obtuvo crecimiento cuando se sometió a temperaturas de 14°, 17, 21,24, 28, 32 y 36 °C por lo que coincide con Ochoa (2001), citado por Quinto (2004), quien señala que para que la enfermedad sea favorecida debe de haber alta humedad de 60 al 90 %, temperatura de 12 a 36 °C en campo para el desarrollo de la enfermedad.

C. gloeosporioides en medio de cultivo PDA a 8°C de temperatura no mostró ningún desarrollo después de haber sido sembrado, lo que coincide con Morales (2000), quien señala que tras probar 13 diferentes temperaturas (4°, 7,9, 10, 13, 16, 18, 24, 27, 30, y 40°C), determinó que a 8°C el hongo creció 1 mm al cuarto día y mantuvo este

crecimiento lento de manera constante; por lo concluyo que la temperatura base de crecimiento de *C. gloeosporioides* es de 8 °C.

En tratamiento con temperaturas de 32°C invadió la caja en 11 días, seguido por el tratamiento a 17°C que fue a los 12 días. En tratamiento de temperatura de 14°C el hongo lleno la caja a los 17 Días dejando atrás al tratamiento de 36 °C.

De acuerdo con el análisis estadístico de la lectura registrada a los 8 días de crecimiento, éste nos muestra que en las temperaturas antes mencionadas, no hay diferencia significativa entre los tratamiento a 21°, 24°, 28°C de temperatura, sin embargo si hay diferencia significativa con respecto a las temperaturas de 8°, 14°, 17°, 32°, y 36 °C.

CONCLUSIONES. De acuerdo con los resultados obtenidos de este estudio se concluye: Se identificó a *C. gloeosporioides* causante de la Antracnosis en frutos de Aguacate. En las pruebas de patogenicidad los frutos inoculados por *C. gloeosporioides* mostraron síntomas a los 16 días de inoculación del patógeno. Se determinó que la temperatura óptima para el desarrollo de *C. gloeosporioides* fue de 21–28°C, ya que desarrollo en menos tiempo, y no hay diferencia significativa entre ambos, a 8°C y 36°C no mostró ningún desarrollo.