

■ Caracterización molecular de especies de *Colletotrichum* asociadas a Antracnosis en aguacate de la región centro de Michoacán

F. Méndez Jaimes¹, B.Tlapal Bolaños¹, A. Almaraz Sanchez², M.P. Saraiva Câmara³, W.Guerreiro Lima³, J.Silva Veloso³, C. Almeida da Costa³, M.S. Brito Netto³, S.J. Michereff³

¹. Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, México.

². Departamento de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, México.

³. Departamento de Agronomía, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil.

RESUMEN

Colletotrichum spp. son especies de hongos asociadas a daños en ramas, flores y frutos de aguacate, relacionadas con el síntoma conocido como antracnosis. En años recientes es considerado uno de los patógenos más importantes que limitan la producción del cultivo en México, ya que afecta de forma significativa la calidad del fruto y rendimiento comercial. Los antecedentes previos soportan un estudio a fondo de las especies involucradas para sentar las bases hacia un manejo regionalizado de acuerdo a las especies presentes. Para ello se realizó una investigación para determinar la diversidad de las especies involucradas en una de las regiones de producción en Michoacán. Se colectaron frutos de cinco huertos de la región centro de Michoacán, los cuales se tomaron de acuerdo a la superficie de cada sitio, se llevaron al laboratorio donde se hicieron los aislamientos y la purificación de los mismos, obteniéndose 96 aislados de *Colletotrichum*. Posteriormente se agruparon de acuerdo a cada región y se procedió a realizar la extracción de DNA a través de cultivos desarrollados en papa dextrosa agar. El DNA de cada aislado fue procesado a través de PCR con el gen de la deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el software MEGA5.22 para comparar con las especies pertenecientes a los complejos de *Colletotrichum* depositados en el GenBank. El análisis filogenético mostró que hay gran diversidad en los aislamientos, y se agruparon dentro de los complejos de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum boninense*, de los 4 haplotipos que resultaron, solo se seleccionaron 22 aislados como muestra representativa para realizar las reacciones con los genes complementarios que fueron actina, calmodulina, β -tubulina y la región ITS, los cuales continúan en estudio.

Palabras clave: PCR, GAPDH, ITS, Haplotipos.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, México es el principal productor, exportador y consumidor de manera sostenida de aguacate (*Persea americana* Mill), convirtiéndose de una fruta exótica en un alimento incluido en la dieta de muchos países; tendencia reforzada por la creciente demanda mundial por los productos naturales. En el ámbito internacional, la explotación comercial de aguacate se ha intensificado en las últimas dos décadas, incrementando su producción en 550,000 toneladas durante los últimos 15 años (García *et al.*, 2008). La producción nacional es de más de un millón de toneladas, de las cuales se exportan más de 200 mil y aportan ingresos por 20,000,000 millones de pesos anuales. Además del mercado estadounidense, México exporta a países de la Unión Europea, Centroamérica, Canadá, Japón, Corea y China, entre otros. Específicamente en Michoacán, el cultivo del aguacate genera cerca de 250 mil empleos directos e indirectos, por lo que contribuye a contener la migración de Michoacán hacia los Estados Unidos; la producción de este estado en 2014 reportó 127,084.07 hectáreas y una producción de más de un millón de toneladas, ocupando el 72.23% de la producción nacional (SIAP, 2014). Entre los factores que limitan la productividad y longevidad del árbol del aguacate están las enfermedades, las cuales son varias, donde están involucrados un gran número de patógenos, sin embargo, la de mayor importancia económica por las pérdidas que ocasiona es la antracnosis *Colletotrichum* spp., cuyo síntoma principal se observa en los frutos después de la cosecha. El patógeno tiene la capacidad de permanecer en dormancia por semanas o meses mientras el fruto es inmaduro. Los conidios del hongo germinan sobre la cascara de frutos de aguacate, producen apresorios, proceso inducido por la presencia de alcoholes y grasas presentes en la cascara. Los apresorios producen las infecciones de síntoma de clavo que rompen la capa de cera y alcanzan las células epidermales subyacentes. Es hasta la cosecha y cuando los frutos maduran que las infecciones en dormancia se activan, causando daños a los frutos (Prusky & Keen, 1993). La enfermedad se ha observado con incidencia alta en todos los municipios de Michoacán sobre el cv. 'Hass'. Su principal daño es en el fruto en la huerta, en el transporte, almacén o mercado. Manchas circulares aparecen sobre el fruto, el centro de éstas pueden hundirse ligeramente y agrietarse. Con humedad alta, el centro de las manchas muestra un polvo y granos color salmón, que corresponden a las esporas del hongo en su estado anamórfico (Morales, 2001). La infección ocurre generalmente en la floración pero se manifiesta hasta después de la cosecha. En lugares con mucha humedad ambiental los síntomas se pueden presentar también en las hojas en forma de manchas de color café claro que llegar a juntarse, además puede observarse una necrosis café-oxidada que se inicia en el margen, posteriormente las hojas se caen. Ataques severos pueden defoliar seriamente un árbol. La infección puede pasar de las hojas al peciolo y después causar lesiones color café o púrpura en brotes y ramas jóvenes y terminar con unos abultamientos acompañados de savia de color blanco, síntoma conocido regionalmente como sarampión. Cuando progresa la madera de los brotes causa marchitez de puntas o tizón apical de ramas y muerte descendente. Las panículas infectadas se ennegrecen o atizonan originando la caída de flores 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 es mayor cuando el fruto es pequeño. Las lesiones en el fruto son circulares y de color café claro, tornándose posteriormente café a negro claro y de consistencia corchosa conocida como viruela o clavo. Los daños importantes ocurren en post-cosecha, durante el transporte o en el almacenamiento o en anaqueles (Bailey & Jerger, 1992). El inoculo primario viene de hojas infectadas y caídas en el suelo, y de ramas y frutos momificados, sobre los que se producen abundantes conidios. Los conidios y las ascosporas se dispersan con ayuda de la lluvia. La enfermedad se favorece por ambiente húmedo y fresco de temperaturas de 10 a 20°C y humedades relativas mayores al 80%. Con las condiciones mencionadas el periodo de incubación tarda 30 días (Ávila *et al.*, 2002). En los últimos cinco años la enfermedad se presenta en frutos jóvenes aun en el árbol, lo que rompe el esquema tradicional de daños observados en postcosecha; Morales

et al. (2009) asociaron a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* como responsables de estos síntomas en campo; Silva-Rojas & Ávila-Quezada (2011) reportaron a las especies *C. gloeosporioides* (71%), *C. acutatum* (16%) y *C. boninense* (13%) en la región productora de Tancítaro, Michoacán. Freeman *et al.* (1998) señalan que un mismo hospedante puede presentar múltiples especies causando la enfermedad y resalta el papel que juegan las especies de cultivos que rodean las plantaciones del cultivo de interés mencionando que puede ocurrir una patogenicidad cruzada. La identificación de especies de *Colletotrichum* ha sido difícil debido a la falta de características morfológicas fiables ya que existen especies confusas Hyde *et al.* (2014). Muchas de esas características morfológicas son plásticas, variando los métodos y condiciones experimentales, lo que puede influir en la caracterización morfológica e generar sobreposiciones entre las especies. (CAI *et al.*, 2009; CANNON *et al.*, 2012; DAMM *et al.*, 2009; HYDE *et al.*, 2009). Por eso, la utilización de caracteres moleculares, como datos de secuencias de DNA, se presenta como una herramienta ventajosa para la taxonomía de hongos, una vez que pueden ser analizadas estadísticamente para inferir en las relaciones filogenéticas. (SHENOY; JEEWON; HYDE, 2007). Con base en los puntos citados anteriormente la importancia de esta enfermedad para el cultivo de aguacate es de gran importancia y el conocimiento sobre la identificación de especies de *Colletotrichum*, que ocurren en la región de Michoacán, a través de estudios basados en características moleculares del agente causal. Una vez que las estrategias de manejo pueden diferir conforme a la especie involucrada, el presente proyecto pretende monitorear por zonas la existencia de la diversidad genética presente en cada una de las regiones con la finalidad de establecer un manejo regionalizado acorde a las especies que se presenten.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo y aislamiento, se colectaron frutos de aguacate cv Hass con síntomas de antracnosis, de viruela, con manchas superficiales con cuarteaduras en la lesión, en cinco sitios que comprende la región centro del estado de Michoacán, México. Las muestras de tejido enfermo se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% durante 3 minutos, posteriormente se sembraron en medio de cultivo compuesto por papa, dextrosa y agar (PDA). Después se realizó punta de hifa para obtener 96 aislamientos puros. Extracción de DNA los aislados fueron puestos a crecer en PDA por 7 días a 25°C con 12 horas de luz, para después con asas esterilizadas fue raspado una pequeña cantidad de micelio de la superficie de la colonia, usando el protocolo de extracción del departamento de fitopatología de la Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil. Amplificación por PCR y secuenciación de DNA amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) gliceraldehído-3 fosfato (GAPDH) como medida inicial para determinar la diversidad genética en base a los haplotipos, la amplificación por PCR para GAPDH se llevaron a cabo usando los primers par GDF1 y GDR1 (Templeton *et al.* 1992) Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl que contenía 1 µl de ADN, 28,2 µl de agua, 2,5 µl de cada primer, 5 µl de 10x tampón de PCR, 4 µl de MgCl₂, 0,3 µl de Platinum Taq ADN polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen™) y 1,5 µl DMSO² y 5,0 µl dNTP (Invitrogen™). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (MultiGene™ OptiMax; Labnet internacional, Edison, NJ, EUA). Los parámetros de los ciclos para GAPDH, consistían en un paso desnaturalización a 94 ° C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94 ° C durante 45 s, 60 ° C durante 45 s, 72 ° C durante 1 min y un ciclo final a 72 ° C durante 10 minutos.

Los productos amplificados de PCR fueron revelado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en 1.0 EDTA más Tris-acetato (TAE) y se fotografiaron bajo luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio (0.5 µl) durante un minuto. Los productos de PCR. Fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

Análisis filogenético, la calidad de las secuencias de nucleótidos fueron analizados utilizando el programa Staden Package (STADEN *et al.* 1998), además de formar los contiguos. La alineación de múltiples secuencias se realizó utilizando el programa ClustalW implementado en el programa MEGA v. 5 (Tamura *et al.* 2011), y se ajustó cuando fue necesario de forma manual.

Para construir un árbol de distancia se utilizó el Neighbor Joining (NJ) algoritmo (Saitou y Nei 1987) fue construida en el MEGA v. 5 para identificar los haplotipos entre las secuencias. Las secuencias se compararon con la base de datos de secuencias NCBI usando el algoritmo BLAST como una identificación aproximada para usarla en el análisis filogenético. Con las secuencias obtenidas, fue realizado un análisis Verosimilitud en Mega v.5.

RESULTADOS

El análisis inicial de la secuencia parcial del gen GAPDH de 96 aislados demostró que hay diversidad genética de especies de *Colletotrichum* asociadas al cultivo de aguacate con un total de 4 haplotipos (H1-H4) (Figura 1) y más de un complejo asociado a antracnosis; el H1 con 14 aislados y H2 con 46 aislados que corresponden al complejo *C. gloeosporioides* (77.95%) siendo este con mayor prevalencia. (Figura 2), el H3 con 7 aislados que se agruparon en el complejo *C. acutatum* (9.03%) (Figura 3) por último el H4 con 10 aislados que corresponde al complejo *C. boninense* (12.96%) (Figura 4). El árbol filogenético muestra las relaciones filogenéticas de las especies de *Colletotrichum* que pertenecen a los haplotipos H1 y H2 (Figura 2), H3 (Figura 3) y por último H4 (Figura 4), aislados de aguacate. La barra de escala indica el número de sustituciones por posición de nucleótido.

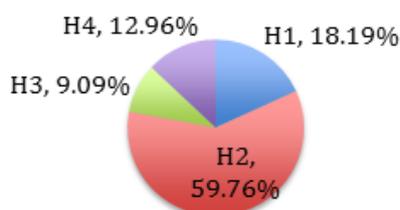


Figura 1: Distribución de los haplotipos

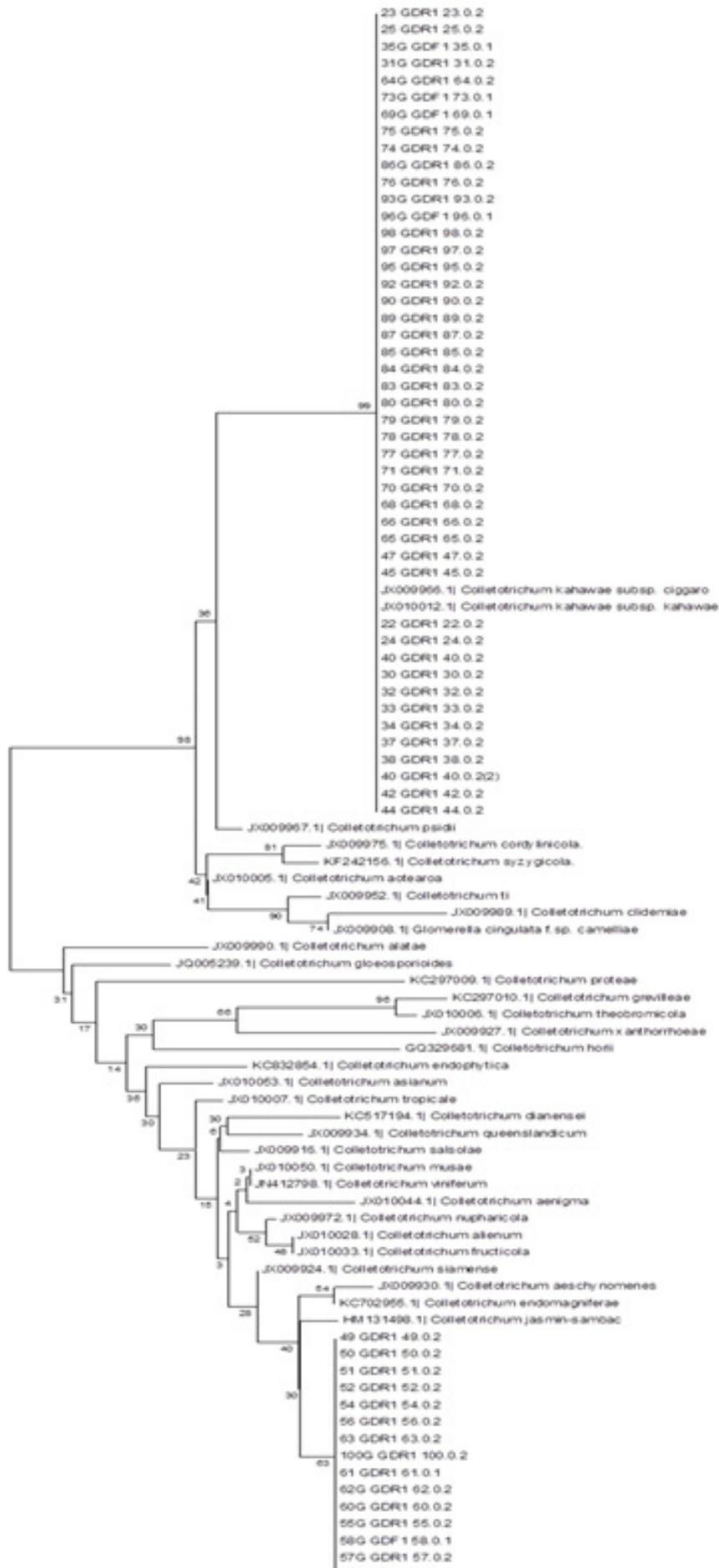


Figura 2. Árbol filogenético del complejo *Colletotrichum gloeosporioides*

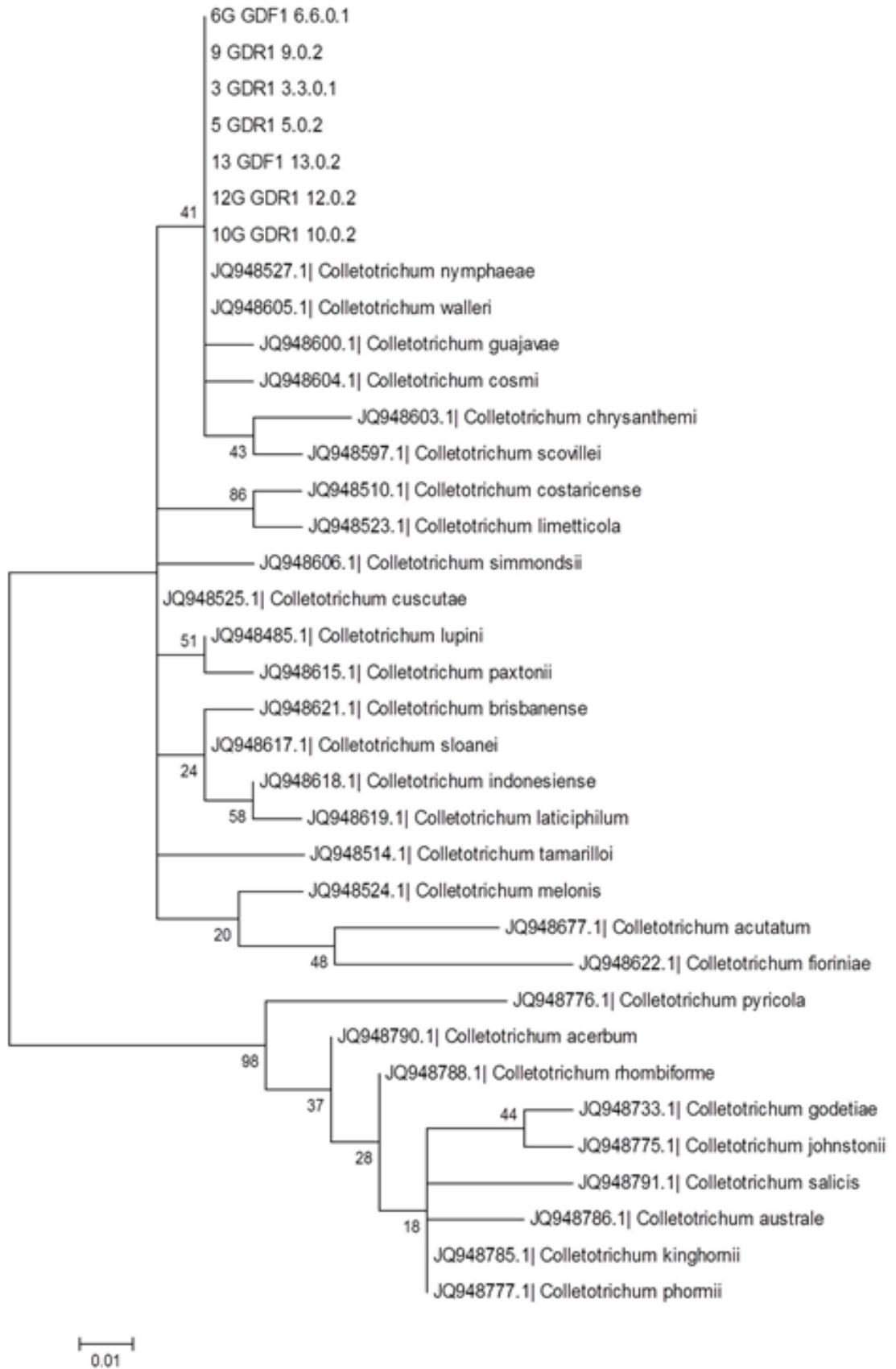


Figura 3. Árbol filogenético del complejo *Colletotrichum acutatum*

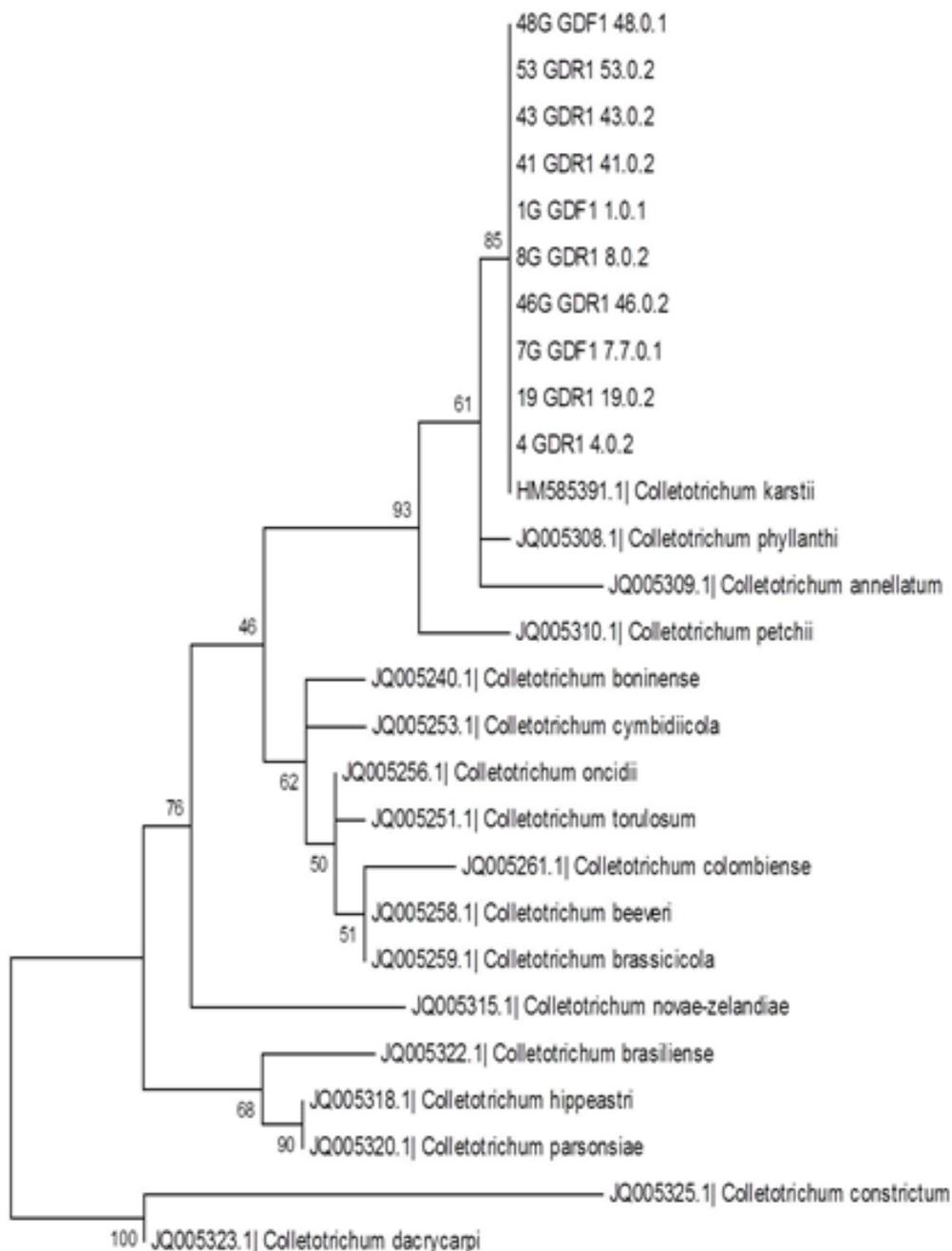


Figura 4. Árbol filogenético del complejo *Colletotrichum boninense*

DISCUSIÓN

Según Silva-Rojas y Ávila-Quezada (2011) reportaron a las especies *C. gloeosporioides* (71%), *C. acutatum* (16%) y *C. boninense* (13%) las cuales coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación mostrados en la Figura 1. Hyde *et al* (2014) reporta que la forma clásica de identificar las especies de *Colletotrichum* es difícil debido a la falta de características morfológicas fiables y a que existen especies confusas, por cual organizo al género *Colletotrichum* en complejos. Con los cuales facilita la identificación de las especies involucradas. Entre tanto, como los genes utilizados en la identificación de *Colletotrichum* no son eficientes individualmente para diferenciar las especies pertenecientes al género (HYDE *et al.*, 2014), se sugirió el uso de marcadores múltiples (CAI *et al.*, 2009). El análisis filogenético basado en las secuencias de nucleótidos concatenados es decir, que comprende dos o más regiones genómicas en el estudio, aumenta el grado de certeza en las inferencias filogenéticas debido al mayor número de nucleótidos analizados, disminuyendo el riesgo crear arboles de genes en vez de árboles de especies (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000; CROUCH *et al.*, 2009; DAMM *et al.*, 2009). Por lo tanto, otras regiones genómicas, tales como las secuencias de actina, β -tubulina, calmodulina, región ITS y Apn2/MAT están siendo estudiadas en este patosistema para promover una evaluación más detallada de las especies relacionadas con aguacate y antracnosis en la región de Michoacán .

CONCLUSIONES

Las especies causantes de antracnosis en aguacate en la región centro de Michoacán se encuentran en los complejos *C.gloeosporioides*, *C.acutatum*, *C.boninense*.

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a dios y a mi familia por permitirme llegar hasta donde estoy, también agradezco a la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola por permitirme desarrollarme académicamente, así como a las Universidade Federal Rural de Pernambuco por su hospitalidad al recibirme.

LITERATURA CONSULTADA

- Ávila, Q.G.D., Téliz, O.D., González, H.H., Vaquera, H.H., Tijerina, Ch.L. Johansen, N.R. Y Mojica, G.A. 2002. Dinamica espacio-temporal de la roña (*Elsinoe perseae*), el daño asociado a trips y antracnosis (*Glomerella cingulata*) del aguacate en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1): p.77-87.
- Bailey A.J. and Jeger, J.M. 1992. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. 388p.
- Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Waller, J., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang, Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., Mckenzie, E. H. C., Johnston, P. R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39 (1): p. 183-204.
- Cannon, P. F., Bridge, P. D., Monte, E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Eds.). *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host pathogen interaction*. St. Paul: APS Press, 2000. p. 1-20.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73 (1): p. 181-213.
- Crouch, J., A., Clarke., B. B., White, J. F., Hillman., B. I. 2009. Systematic analysis of the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species of the fungus from warm season grasses. *Mycologia* 101(5): p. 717-732
- Damm, U., Woudenberg, J. H. C., Cannon, P. F., Crous, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39 (1): p. 45-87, 2009
- FAOSTAT. 2014. Online statistical database of the Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/>. Consultado 14 AGOSTO 2015
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82: 596-605
- García, P.E. y E. M. Castro. 2008. "El aguacate en México, origen y amenazas". *Revista Ciencia y Desarrollo*, Noviembre Vol. 34(225) p. 16-22
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., Prihastuti, H., Hyde, K. D. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39:1-17
- Morales, G.L. 1996. Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate en Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 96 p.
- Morales, G. L. 2001. Enfermedades del fruto del aguacate. In: *El aguacate y su manejo integrado*. Edit. Téliz, D. Ediciones Mundi-Prensa. México. P. 142-146.
- Prusky, D., Keen, N.T. 1993. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. *Plant Dis.* 77: 114-119.
- Prusky, D., Keen, N.T., Sims, J.J. and Midland, S. 1982. Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 72: 1578-1582
- Prusky, D., Wattad, C. and Kobiler, I. 1996. Effect of ethylene on activation of lesion development from quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(9): 864-868.
- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre del Ciclo 2014. Disponible en <http://www.siap.gob.mx/resumen-pecuario/> Publicado enero 2015, Obtenido

- Shenoy, B. D.; Jeewon, R.; Hyde, K. D. 2007. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity* 26 (1): p. 1-54.
- Staden, R., Beal, K. F., Bonfield, J. K. The Staden package. 1998. In: Misener S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics methods and protocols*. Humana, 115–130p.
- Tamura; Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, Oxford: Oxford University Press 28: p. 2731–2739.
- Templeton, M. D., Rikkerink, E. H. A., Solon, S. L., Crowhurst, R. N. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122:225–230.



ACTAS • PROCEEDINGS

VIII CONGRESO MUNDIAL DE LA PALTA 2015

del 13 al 18 de Septiembre. Lima, Perú 2015

www.wacperu2015.com

