

***Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* PRINCIPAL AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN POSTCOSECHA DEL AGUACATE**

Herrera-González, Juan Antonio^{1, 2}; Gutiérrez-Martínez, Porfirio²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Uruapan, Avenida Latinoamericana 1101, Uruapan, Michoacán 60150. Tel. (553) 871-8700 Ext. 84202. Correo-e: juanherreragonzalez@gmail.com

²Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos, Instituto Tecnológico de Tepic. Av. Tecnológico 2595, Lagos de Country, Tepic, Nayarit 63175, México.

Resumen

La región del Pacífico centro de México cuenta con la mayor producción de aguacate en México. A nivel mundial, se han identificado 16 enfermedades postcosecha en aguacate, de las cuales antracnosis es la que predomina y es causada por un complejo de especies pertenecientes a *Colletotrichum gloeosporioides*. El objetivo del estudio fue identificar a hongos patógenos causantes de antracnosis en postcosecha de aguacate de la región del Pacífico centro de México. En 2019 se obtuvieron muestras de frutos de aguacate cv. Hass de cinco huertos comerciales de aguacate en Michoacán, uno de Jalisco y dos de Nayarit. Los frutos se incubaron hasta el desarrollo de antracnosis, se aislaron cepas que causaron la enfermedad, las cuales se identificaron morfológica y molecularmente, y se construyó un árbol filogenético para verificar la relación entre las cepas aisladas. De los hongos patógenos causantes de antracnosis en frutos de aguacate en postcosecha se aislaron 5 cepas de Michoacán, 2 de Nayarit y una de Jalisco. Los números de accesoión en el GenBank de las secuencias ITS (ITS1-ITS4) mostraron porcentajes de cobertura entre 99-100 % e identidad entre 99-100 % con *C. gloeosporioides*. Por lo que se confirma la identidad de los aislados de hongos patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* basados en las características morfológicas y secuencias moleculares analizadas.

Palabras clave: *Persea americana* Miller, Hongos, Caracterización morfológica y molecular.

***Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* MAIN CAUSAL AGENT OF AVOCADO ANTHRACNOSIS IN POSTHARVEST**

Abstract

The central Pacific region of Mexico have the highest cv. Hass avocado production in Mexico. Worldwide 16 postharvest diseases have been identified in avocado, of which anthracnose is the predominant disease, and *Colletotrichum gloeosporioides* species complex is the causal agent. The study aimed to identify pathogenic fungi that cause anthracnose in the postharvest of Hass avocado in the central Pacific region of Mexico. In 2019, avocado fruits were sampled from five commercial orchards in Michoacán, one in Jalisco, and two in Nayarit. The fruits were incubated until the development of anthracnose, strains that caused the disease were isolated, a morphological and molecular identification was carried out and a phylogenetic tree was made to verify the relationship between the isolated strains. Five isolates from Michoacán, 2 from Nayarit, and one from Jalisco of pathogenic fungi causing anthracnose in postharvest avocado fruits were isolated. The accession numbers in the GenBank of the ITS sequences (ITS1-ITS4) showed coverage between 99-100 % and identity between 99-100 % with *C. gloeosporioides*. Therefore, the identity of the isolates of pathogenic fungi corresponded to *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* based on the characteristics, morphological, cultural, and molecular sequences analyzed is confirmed.

Key words: *Persea americana* Miller, Fungi, Morphology and molecular characterization.

Introducción

La región del Pacífico centro de México es la zona de mayor producción de aguacate cv. Hass en México. En esta región, se cosecha el 88 % de la producción nacional (2.1 millones de t) (SIAP-Producción Agrícola, 2020). Aunque se han identificado, a nivel mundial, 16 enfermedades de postcosecha en aguacate, antracnosis es la que predomina y es causada por un complejo de especies pertenecientes a *Colletotrichum gloeosporioides* (Bill et al., 2014; Bautista-Baños et al., 2019). Las pérdidas en postcosecha pueden variar dependiendo del periodo de almacenamiento en refrigeración, donde de 1-2 semanas, las pérdidas postcosecha pueden ascender hasta un 20 % y de 3-5 semanas de refrigeración, la pérdida potencial puede ser de 80-100 % (Boonruang et al., 2017; Pedreschi et al., 2019).

Aunque el desarrollo de antracnosis se presenta en postcosecha, la infección del patógeno por *C. gloeosporioides sensu lato*, se muestra en las primeras etapas de desarrollo del fruto, a través de heridas, aberturas naturales o por penetración directa de la cutícula. Sin embargo, por la actividad antifúngica del fruto, el hongo permanece por debajo de la cutícula en estado latente (quiescente), hasta que el fruto comienza el proceso de maduración después de la cosecha (Rodríguez-López et al., 2009; Prusky et al., 2013).

Para un control eficiente de antracnosis en postcosecha, es necesario la identificación del patógeno agente causal. *Colletotrichum gloeosporioides*, por la amplitud de hospederos y climas, su patogenicidad y virulencia, puede variar geográficamente. La identificación con base a las características morfológicas es limitada, por lo que es necesario, usar técnicas moleculares. El primer ITS (5.8 S ribosomal RNA) permite la identificación a nivel género y especie, aunque no es un primer específico para *C. gloeosporioides*, permite identificar al complejo de especies de *C. gloeosporioides* (Sharma et al., 2017) y construir árboles filogenéticos. El objetivo del presente estudio fue identificar a hongos patógenos causantes de antracnosis en postcosecha de frutos de aguacate cv. Hass de la región del Pacífico centro de México.

Materiales y Métodos

Muestreo y aislamiento de hongos

En 2019, se obtuvieron muestras de frutos de cinco huertos comerciales de aguacate cv. Hass de Michoacán, uno de Jalisco y dos de Nayarit. En cada huerto se cosecharon 20 frutos, sin daños mecánicos (cortadas y heridas) y visiblemente sanos (calidad suprema), éstos se incubaron a 24 ± 2 °C y 90 ± 5 % de humedad relativa (HR) hasta que la antracnosis se desarrolló,

que fue entre 7-10 días. En los frutos, donde se presentaron con más rapidez los síntomas de antracnosis, se obtuvieron muestras las cuales fueron sembradas en agar papa dextrosa (PDA; DIBICO, Cuautitlan Ixcali, México) e incubadas a 27 ± 2 °C y 90 ± 5 % HR. Los cultivos fueron purificados por resiembras sucesivas y para garantizar la identidad y pureza de cada aislado, y colonias genéticamente homogéneas, se realizaron cultivos monospóricos con diluciones de esporas de 1:10, 1:100 y 1:1000, donde las esporas germinadas en agar-agua, se sembraron en agar PDA (Uysal y Kurt, 2020). Las cepas caracterizadas, se inocularon en frutos de aguacate cv. Hass para confirmar los postulados de Koch, realizando nuevamente los aislamientos para corroborar la identificación.

Identificación morfológica

Para la identificación morfológica, cada cepa aislada fue inoculada en cajas de Petri con PDA e incubada a 27 ± 1 °C por 7 días. Cada 24 horas se midió el diámetro de la colonia y se calculó la velocidad de crecimiento en mm/día. En el día 7 de incubación se realizó una descripción morfológica basada en el color de la colonia (micelio), color de masas conoidales y presencia de acervulos. Además de forma, longitud y diámetro de espora.

Identificación molecular

Para confirmar la identificación, género y especie, de los aislados de las cepas de *Colletotrichum*, se utilizó la técnica por PCR. La extracción de ADN de las cepas se realizó mediante la técnica descrita por Doyle y Doyle (1990). Las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) del rDNA fueron amplificadas mediante los dos indicadores: ITS1 (5'CAACTCCCAAACCCCTGTGA-3') e ITS4 (5'GCGACGATTACCAGTAACGA-3'). Las amplificaciones, por PCR, se realizaron en un termociclador (Applied Biosystem® GeneAmp® PCR System 9700, California, EUA) tomando 15 µL de mezcla de reacción que contenían 0.18 mL de cada indicador (primer), 0.18 mL de DNTPs, 0.9 U de GoTaqVR ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, USA) y 3 mL de indicador. Las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineación a 58 °C por 1 min y una extensión a 72 °C por 2 min y finalmente, una extensión a 72 °C por 10 min. Las amplificaciones de PCR fueron limpiadas usando ExoSAP-IT® (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) y secuenciadas usando BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™) en un 3130, analizados con un secuenciador genético (Applied Biosystems™) del Colegio de Postgraduados (Silva-Rojas and Ávila-Quezada, 2011; Fuentes-Aragón et al., 2018).

Árbol filogenético

El árbol filogenético se construyó utilizando el algoritmo Neighbor-Joining construido en 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 (Jaimes et al., 2015).

Resultados y Discusión

Identificación morfológica

De los hongos patógenos aislados causantes de antracnosis en frutos de aguacate cv. Hass en postcosecha (Figura 1), cinco fueron de Michoacán, dos de Nayarit y uno de Jalisco. La identificación preliminar, mostró algunas características similares entre las cepas aisladas. La velocidad de crecimiento fue entre 11 y 13 mm/día. Las características de las colonias de los ocho aislados, se caracterizaron por micelio aéreo de color blanco a gris oscuro, con anillos concéntricos, con presencia de acérvulos, masas conoidales anaranjadas y esporas de forma cilíndrica a elipsoidal ($44 \pm 4 \mu\text{m}$ de longitud y $13 \pm 2 \mu\text{m}$ de diámetro) (Figura 2).

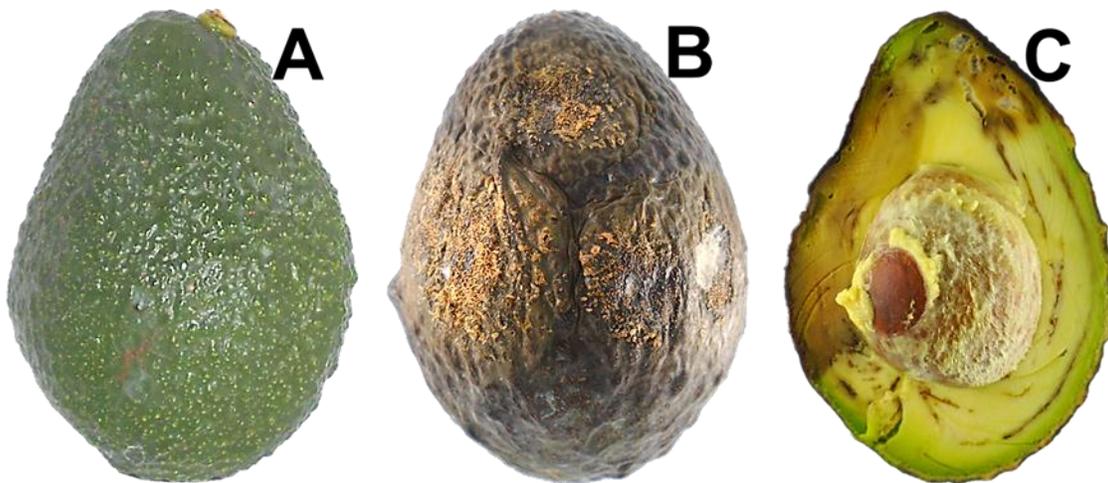


Figura 1. A) fruto de aguacate 'Hass' completamente sano al momento de la cosecha, B) fruto con síntomas externos de antracnosis y C) síntomas internos de antracnosis.

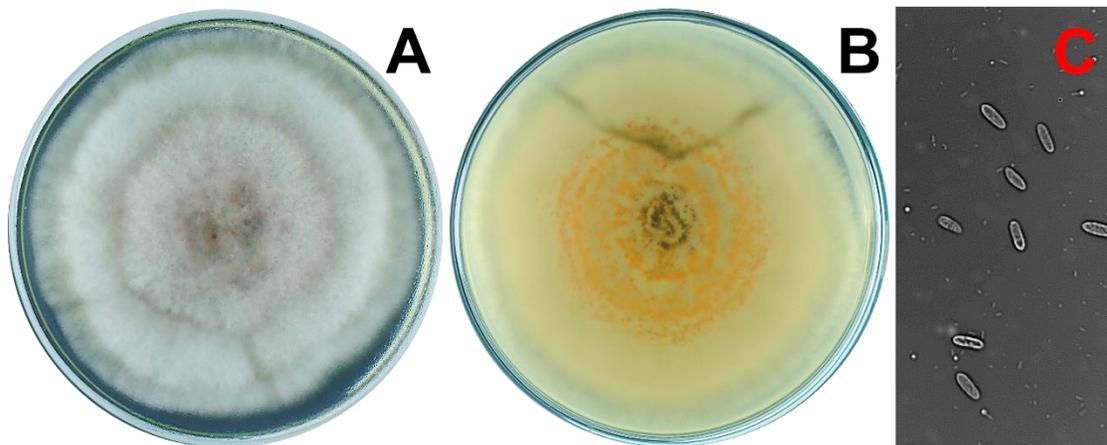


Figura 2. Colonias de especies de *Colletotrichum* en PDA después de 7 días de incubación ($27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) aisladas de aguacate 'Hass'. A) frente de la caja, B) revés de la caja y C) esporas del hongo.

Identificación molecular

Los números de accesoión en el GenBank de las secuencias ITS (ITS1-ITS4) mostraron porcentajes de cobertura entre 99-100 % e identidad entre 99-100 % con *C. gloeosporioides* (Cuadro 1), por lo que se confirma la identidad de los aislados de hongos patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* basados en las características, morfológicas, culturales y secuencias moleculares analizadas (Figura 4).

Cuadro 1. Número de accesoión, cobertura e identidad de las secuencias ITS con el género *Colletotrichum* usado en el análisis filogenético.

Aislado	GenBank	Cobertura (%)	Identidad (%)	Especie asignada
1. Up Cg M4	KX022506.1	100	99.82	<i>C. gloeosporioides</i>
2. Tin Cg M13	MK426765.1	100	100	<i>C. gloeosporioides</i>
5. Tan Cg M40	KX022506.1	100	99.65	<i>C. gloeosporioides</i>
6. LRe Cg M46	KU662388.1	99	100	<i>C. gloeosporioides</i>
7. LRe Cg M48	KU662388.1	99	100	<i>C. gloeosporioides</i>
8. Tpc Cg N8	KX022503.1	100	99.82	<i>C. gloeosporioides</i>
9. Xal Cg N22	KU662388.1	100	99.82	<i>C. gloeosporioides</i>
10. CdG Cg J22	KU662377.1	99	99.83	<i>C. gloeosporioides</i>

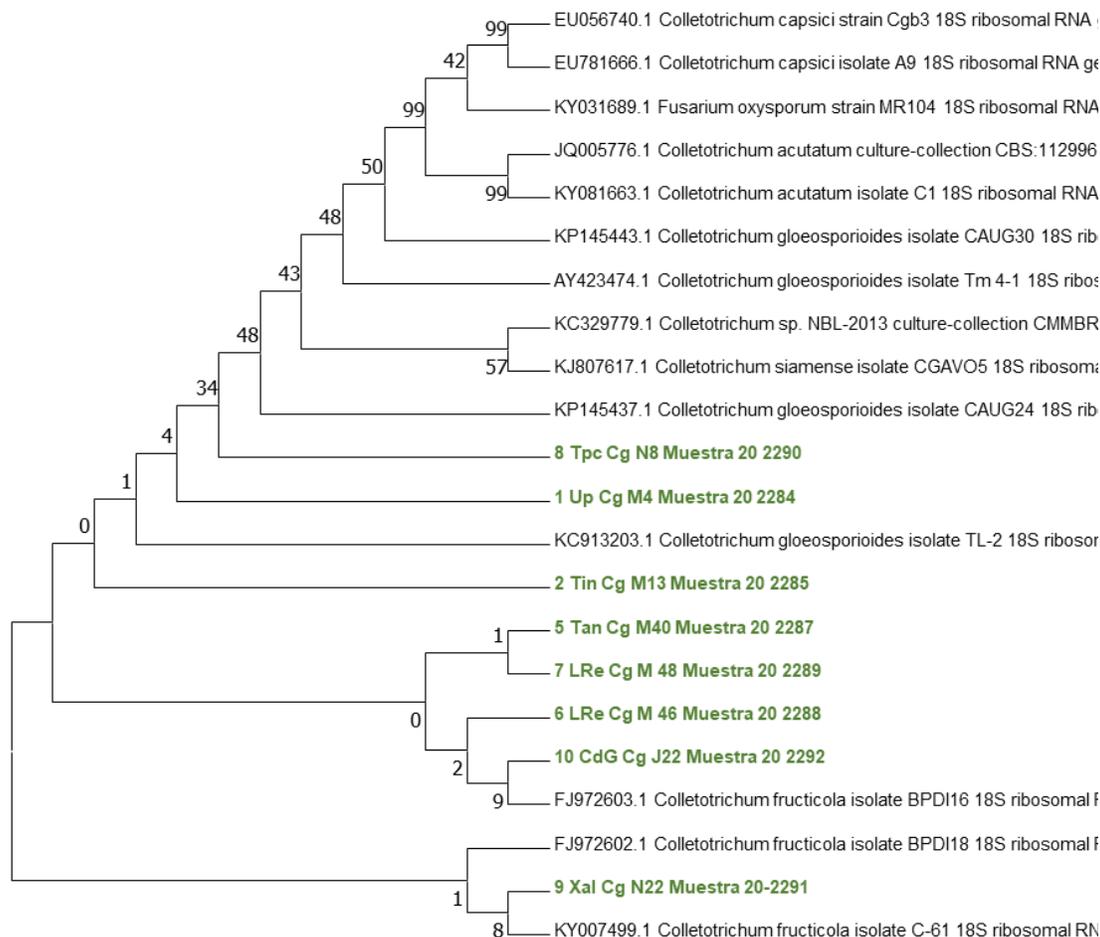


Figura 3. Árbol filogenético de ocho aislados de pertenecientes al complejo de especie de *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidos de frutos de aguacate cv. Hass cosechados libre de daños mecánicos y completamente sanos muestreados en la región del Pacífico dentro de México, posteriormente con síntomas de antracnosis en postcosecha.

Colletotrichum gloeosporioides sensu lato ya ha sido reportado en México como agente causal de antracnosis en pre y postcosecha aguacate cv. Hass (Fuentes-Aragón et al., 2018). Las especies más prevalecientes y virulentas pertenecientes a este complejo son *Colletotrichum chrysophilum*, *C. siamense*, *C. jiangxiense*, *C. tropicale* y *C. cigarro* (Fuentes-Aragón et al., 2020) reportadas en México para aguacate.

Es importante, centrar la atención en *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* como el principal agente causal de antracnosis en aguacate en pre y postcosecha. El control de antracnosis en postcosecha podría llevarse a cabo mediante métodos químicos y no químicos (natural, biodegradable y no tóxico). Será importante evaluar tratamientos de baja residualidad que puedan

ser aplicados en precosecha cuando aún esta adherido al árbol y cercanos a la cosecha, y en poscosecha, que permitan disminuir la concentración del patógeno. Algunos compuestos naturales pueden tener actividad antifúngica y actividad inductora de mecanismos de defensa en células vegetales (Munhuweyi et al., 2020). Estas sustancias consideradas GRAS (generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas en inglés) pueden desestabilizar la pared celular del hongo, y la membrana plasmática, mediante interacciones electrostáticas, solubilización de proteínas o peroxidación de lípidos. Algunas de estas sustancias pueden ser quitosano, aceites esenciales, ácido salicílico, silicatos, ácido jasmónico, propóleo, sales orgánicas, ácido hiperacético, entre muchas otras (González-Estrada et al., 2020).

Conclusiones

El agente causal de antracnosis en la región del Pacífico centro de México es *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*. En futuros estudios, será necesario buscar métodos amigables con el ambiente para el control de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* en pre y poscosecha de aguacate, así como la identificación precisa las especies de este complejo que están causando antracnosis en poscosecha.

Literatura Citada

- Bautista-Baños, S., R. I. Ventura-Aguilar, and M. D. L. Ramos-García. 2019. Avocado. pp. 227-256. In: Palou, L. J., and L. Smilanick, (Eds.). Postharvest Pathology of Fresh Horticultural Produce. CRC Press. London, UK.
- Bill, M., D. Sivakumar, A. K. Thompson, and L. Korsten. 2014. Avocado fruit quality management during the postharvest supply chain. *Food Rev. Inter.* 30:169-202.
- Boonruang, K., N. Kerddonfag, W. Chinsirikul, E. J. Mitcham, and V. Chonhenchob. 2017. Antifungal effect of poly (lactic acid) films containing thymol and R- (-)-carvone against anthracnose pathogens isolated from avocado and citrus. *Food Control* 78:85-93.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Fuentes-Aragón, D., S. B. Juárez-Vázquez, M. Vargas-Hernández, and H. B. Silva-Rojas. 2018. *Colletotrichum fructicola*, a member of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*, is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. Hass. *Mycobiology* 46:92-100.
- Fuentes-Aragón, D., H. V. Silva-Rojas, V. Guarnaccia, J. A. Mora-Aguilera, S. Aranda-Ocampo, N. Bautista-Martínez, and D. Téliz-Ortíz. 2020. *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit in Mexico: Current status. *Plant Pathol.* 69:1513-1528.
- González-Estrada, R., F. Blancas-Benítez, R. M. Velázquez-Estrada, B. Montaña-Leyva, A. Ramos-Guerrero, L. Aguirre-Güitrón, C. Moreno-Hernández, L. Coronado-Partida, J. A. Herrera-González, C. A. Rodríguez-Guzmán, J. A. del Ángel-Cruz, E. Rayón-Díaz, H. J. Cortés-Rivera, M. A. Santoyo-González, and P. Gutiérrez-Martínez. 2020. Alternative eco-friendly methods in the control of post-

- harvest decay of tropical and subtropical fruits. pp. 1-22. In: Kahramanoglu, I., N. E. Kafkas, A. Küden, and S. Çömlekçioğlu (Eds.). *Modern Fruit Industry*. IntechOpen. London, UK.
- Jaimes, F. M., B. T. Bolaños, A. A. Sanchez, M. P. S. Cámara, W. G. Lima, and J. S. Veloso. 2015. Caracterización molecular de especies de *Colletotrichum* asociadas a antracnosis en aguacate de la región centro de Michoacán. pp. 174–180. In: VIII Congreso Mundial de Aguacate 2015. 13 – 18 septiembre, 2015. Lima, Perú.
- Munhuweyi, K., S. Mpai, and D. Sivakumar. 2020. Extension of avocado fruit postharvest quality using non-chemical treatments. *Agronomy* 10:1-21.
- Pedreschi, R., V. Uarrota, C. Fuentealba, J. E. Álvaro, P. Olmedo, B. G. Defilippi, C. Meneses, and R. Campos-Vargas. 2019. Primary metabolism in avocado fruit. *Front. Plant Sci.* 10:1-16.
- Prusky, D., N. Alkan, T. Mengiste, and R. Fluhr. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:155-176.
- Rodríguez-López, E., J. González-Prieto, y N. Mayek-Pérez. 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27:53-63.
- Sharma, G., M. Maymon, and S. Freeman. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Sci. Rep.* 7:15839.
- SIAP-Producción Agrícola. 2020. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (6.25.21).
- Silva-Rojas, H. V., and G. D. Ávila-Quezada. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathol.* 60:899-908.
- Uysal, A., and Ş. Kurt. 2020. First report of fruit and leaf anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* on avocado in Turkey. *Crop Prot.* 133:105145.