



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**PATOGÉNESIS DE *Colletotrichum truncatum*
CAUSANTE DE ANTRACNOSIS EN PAPAYA MARADOL**

Por:

Indira Rojo Báez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN CULIACÁN DEL CIAD EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa

Agosto de 201

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la C. Indira Rojo Báez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



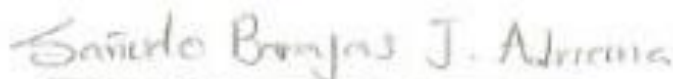
Dr. Raúl Allende Molar
Director de tesis



Dr. Raymundo Saúl García Estrada
Asesor



Dra. Josefina León Félix
Asesor



Dra. J. Adriana Sañudo Barajas
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme su apoyo económico para realizar este posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Coordinación Culiacán por recibirme nuevamente en su programa de posgrado y permitirme realizar el doctorado en sus instalaciones.

Al proyecto 211-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” de SAGARPA por el financiamiento brindado al inicio en este proyecto de tesis.

A mi director de tesis el Dr. Raúl Allende Molar, por recibirme una vez más ahora como su alumna de doctorado, por su apoyo, su orientación, por brindarme su conocimiento y ser un gran director de tesis.

Al resto del comité al Dr. Raymundo García y las Dras. Josefina León y Adriana Sañudo, gracias por ser mis guías en este proyecto, brindarme sus consejos y conocimiento en sus respectivas áreas de investigación.

Al Ing. Isidro Márquez Zequera, técnico del laboratorio de Fitopatología por su ayuda en la realización de la fase experimental, su amistad y buenos consejos.

A la Dra. Apolinar Santamaría Miranda de CIIDIR-IPN Sinaloa, por toda su enseñanza y gran disposición para realizar el análisis histopatológico en su laboratorio, es una persona muy cordial y estusiasta, me alegra haberla conocido.

Al Dr. Benigno Valdez, porque en cada clase de seminario nos motivaba a ser cada día mejores en nuestras investigaciones, nos hizo crecer como críticos. Recuerdo una frase que mencionó en clase “Ser doctor se trata de defender nuestras ideas... hasta la muerte!”.

A mis compañeros de generación 2013-2017: Brando, Talia, Nayeli, Mirian, Rubén y José Luis. Así como a Meche, Dani, Belia, Isabel, Karla, Erick, Anabel, Paola y Jeny, porque compartimos juntos esta experiencia conviviendo día a día en el salón de clase y fuera de él, compartiendo alegrías, preocupaciones y tristezas, fue un placer conocerlos. Un agradecimiento especial a Mercedes y Talia por su valiosa ayuda en el tema de expresión génica.

A mis amigos Brando, María y Ana por ayudarme en problemas tanto laborales como personales, aconsejarme, escucharme, por compartir tantos momentos juntos, salidas al café, “suis”, etc. Por brindarme su valiosa amistad.

A mi compañero de vida durante los últimos 7 años, Víctor Manuel, siempre estuviste a mi lado, apoyándome en todo, soportando mi estrés, escuchando mis penas y preocupaciones, siempre atento, buscando una solución, estudiando sobre PCR en tiempo real para poder ayudarme. Estoy tan agradecida de conocerte y ser tu esposa, te amo demasiado mi amor.

DEDICATORIA

Estos cuatro años de mi vida brindados al doctorado quiero dedicarlos a mi familia:

A mis padres:

María del Carmen Báez e Isidro Rojo, así como a mi tío Bulmaro por toda su fe en mí, por su apoyo y comprensión en todo momento, los quiero mucho.

A mis hermanas:

María Izolina e Irlanda por su apoyo y paciencia en todo momento, las quiero.

A mi esposo:

Victor Manuel Angulo, por siempre estar a mi lado y apoyarme en todo cuando más lo necesitaba.

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY.....	xv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
Esquema de Investigación.....	18
Referencias	20
CAPÍTULO II: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	23
El Cultivo de Papaya	23
Producción	23
Pérdidas a Nivel Poscosecha.....	24
Rango de Hospedantes de Antracnosis	25
Género <i>Colletotrichum</i>	25
Desarrollo de Antracnosis	26
Mecanismo de Infección de <i>Colletotrichum</i> spp.	28
Adhesión	29
Germinación	30
Penetración	31
Nutrición	32
Desarrollo Hemibiotrófico.....	32
Desarrollo Necrotrófico.	33

Estrategias de Infección	34
Colonización Hemibiotrófica Intracelular.	34
Colonización Intramural Subcuticular.....	36
Genes Relacionados a Patogenicidad de <i>Colletotrichum</i> spp.	37
Antracnosis en Papaya.....	41
Estrategia de Infección.....	41
Antracnosis Ocasionada por <i>Colletotrichum truncatum</i>	43
<i>Colletotrichum truncatum</i>	44
Estrategia de Infección.....	45
Genes Relacionados a Patogenicidad en <i>C. truncatum</i>	47
Preguntas de Investigación	48
Problema de Investigación	49
Justificación	49
Objetivos.....	50
Objetivo General	50
Objetivos Específicos	50
Referencias	50
CAPÍTULO III: PRIMER ARTÍCULO	60
Situación Actual de <i>Colletotrichum</i> spp. en México: Taxonomía, Caracterización, Patogénesis y Control.....	60
Resumen.....	61
TAXONOMÍA.....	63
IDENTIFICACIÓN.....	64
ESPECIES DE <i>Colletotrichum</i> DESCRITAS EN MÉXICO	66
PROCESO DE INFECCIÓN	68
CONTROL.....	70
CONCLUSIONES.....	72
LITERATURA CITADA	73
CAPÍTULO IV: SEGUNDO ARTÍCULO	95

PROCESO DE INFECCIÓN DE ANTRACNOSIS POR <i>Colletotrichum truncatum</i> EN PAPAYA MARADOL.....	95
REFERENCIAS	101
CAPÍTULO V: TERCER ARTÍCULO.....	106
Histopatología del proceso de infección de <i>Colletotrichum truncatum</i> en hojas de papaya y chícharo.....	106
Resumen	107
LITERATURA CITADA	112
CAPÍTULO VI: CUARTO ARTÍCULO	118
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL PROCESO DE INFECCIÓN DE <i>Colletotrichum truncatum</i> EN HOJAS DE PAPAYA MARADOL	118
RESUMEN.....	119
INTRODUCCIÓN.....	119
MATERIALES Y MÉTODOS	121
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	125
CONCLUSIONES.....	128
REFERENCIAS	129
MATERIAL SUPLEMENTARIO	134
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES GENERALES	137
Alcances y limitaciones.....	139
Perspectivas futuras	140

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Genes en <i>Colletotrichum</i> expresados durante la infección	38
Cuadro 2. Especies de <i>Colletotrichum</i> reportadas en México con base en caracterización morfológica.	85
Cuadro 3. Especies de <i>Colletotrichum</i> reportadas en México con base en caracterización molecular.	89
Cuadro 4. Iniciadores para qPCR empleados en el estudio.	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la tesis.	20
Figura 2. Características morfológicas del género <i>Colletotrichum</i>	26
Figura 3. Ciclo de vida de la enfermedad de antracnosis causada por <i>Glomerella cingulata</i> y su anamorfo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	27
Figura 4. Etapas generales del mecanismo de infección de <i>Colletotrichum</i> spp	28
Figura 5. Estrategias de infección <i>Colletotrichum</i> spp.	37
Figura 6. Esquema hipotético de los eventos moleculares durante el proceso de pre infección en <i>Colletotrichum</i> spp.	40
Figura 7. Síntomas de antracnosis ocasionados por <i>Colletotrichum</i> spp.	91
Figura 8. Características morfológicas de las principales especies de <i>Colletotrichum</i> en México.	92
Figura 9. Etapas del proceso de infección de <i>Colletotrichum</i> spp. reportadas en México.	93
Figura 10. Colonización intramural subcuticular de <i>C. truncatum</i> en hojas escindidas de papaya cv. Maradol.	93
Figura 11. Fotomicrografías del proceso de infección de <i>C. truncatum</i> en frutos de papaya Maradol en madurez comercial.	105
Figura 12. Microfotografías del proceso de infección de <i>C. truncatum</i> en hojas escindidas de papaya cv. Maradol.	115
Figura 13. Síntomas de antracnosis ocasionados por la cepa CCM de <i>C. truncatum</i> en distintos hospedantes.	116
Figura 14. Microfotografías del proceso de infección de <i>C. truncatum</i> en hojas escindidas de chícharo cv. Lincoln.	116

Figura 15. Expresión relativa de los transcritos del gen <i>CUT1</i> de <i>C. truncatum</i> en diferentes horas después de inoculación (hdi).....	132
Figura 16. Expresión relativa de los transcritos del gen <i>GLS1</i> de <i>C. truncatum</i> en diferentes horas después de inoculación (hdi).....	133
Figura 17. Expresión relativa de los transcritos del gen <i>CHS1</i> de <i>C. truncatum</i> en diferentes horas después de inoculación (hdi).....	133
Figura 18. Proceso de infección de <i>C. truncatum</i> en fruto y hoja de papaya Maradol.....	139

RESUMEN

Colletotrichum truncatum es un hongo fitopatógeno causante de antracnosis en distintos hospedantes. En papaya (*Carica papaya* L.), la antracnosis es responsable de pérdidas postcosecha y presenta una incidencia del 40% en México. De acuerdo a su hospedante, *C. truncatum* utiliza distintas estrategias de infección: la estrategia intracelular en chícharo y lenteja, entre otros; y la estrategia intramural subcuticular en chile; sin embargo, el proceso y la estrategia de infección que ocasiona este patógeno en papaya es desconocido. El objetivo de esta investigación fue analizar el proceso de patogénesis de *C. truncatum* en papaya Maradol mediante técnicas histológicas y moleculares. Se inocularon hojas y frutos de papaya Maradol con una suspensión de 10 μ L a una concentración de 1×10^6 esporas/mL del patógeno y se colectó tejido vegetal a las 0, 2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 y 120 horas después de inoculación (hdi). La técnica histológica consistió en fijación con FAA, tinciones diferenciales de safranina-verde rápido, y observación mediante microscopía óptica. Por su parte, el análisis de expresión génica consistió en la medición de los niveles de expresión temporal de los genes de interés (*CUT1*, *GLS1* y *CHS1*) mediante PCR en tiempo real y el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En las primeras horas después de inoculación (2-24 hdi), se observó la germinación de los conidios mediante tubos germinativos, así como la producción de apresorios melanizados; se elevaron los niveles de transcritos de los genes β -1-3 glucan sintasa (*GLS1*) y quitin sintasa (*CHS1*) e inició la expresión del gen cutinasa (*CUT1*). En el lapso de 24 a 72 hdi se observó colonización por parte del patógeno, se expresaron los genes *CUT1*, *GLS1* y *CHS1*; de las 96 a 120 hdi se observaron hifas secundarias de infección y formación de acérvulos; se elevaron los niveles de transcrito de los genes *CUT1*, *GLS1* y *CHS1*. En

conclusión, *C. truncatum* utiliza la estrategia de colonización intramural subcuticular en hoja y fruto de papaya Maradol, durante este proceso se elevó el nivel de transcrito del gen cutinasa durante el estado necrótrofo; el gen quitin sintasa durante las etapas de germinación y penetración del patógeno y, el gen β -1-3 glucan sintasa durante la germinación, penetración y estado necrótrofo correspondientes a las etapas iniciales y finales del proceso de infección.

Palabras clave: *C. truncatum*, papaya, intramural subcuticular, cutinasa, β -1-3 glucan sintasa, quitin sintasa.

SUMMARY

Colletotrichum truncatum is a phytopathogenic fungus that causes anthracnose in different hosts. In papaya (*Carica papaya* L.), anthracnose is responsible for post-harvest losses and presents an incidence of 40% in Mexico. According to its host, *C. truncatum* uses different infection strategies: the intracellular strategy in pea, and lentil, among others; and subcuticular intramural strategy in pepper; however, the infection process caused by this pathogen in papaya is unknown. The objective of this research was to analyze the pathogenesis process of *C. truncatum* in papaya Maradol by histological and molecular techniques. Papaya Maradol leaves and fruits were inoculated with a spore suspension of 10 μ L at a concentration of 1×10^6 spores/mL of the pathogen, and then vegetal tissues were collected at 0, 2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 and 120 hours after inoculation (hai). The histological technique consisted of fixation with FAA, differential staining of safranin-rapid green and observation by optical microscopy. Gene expression analysis consisted in the measurement of the temporal expression levels of the genes of interest (*CUT1*, *GLS1* and *CHS1*) by real-time PCR and the method $2^{-\Delta\Delta Ct}$. In the first hours after inoculation (2-24 hai), the germination of the conidia was observed by germinative tubes, as well as the production of melanized apresoria; the β -1-3 glucan synthase (*GLS1*) and chitin synthase (*CHS1*) genes were overexpressed and the expression of the cutinase gene (*CUT1*) was initiated. In the period from 24 to 72 hai colonization was observed by the pathogen and *CUT1*, *GLS1* and *CHS1* genes were expressed; at 96 to 120 hai, infection secondary hyphae and formation of acervuli were observed; the *CUT1*, *GLS1* and *CHS1* genes were overexpressed. In conclusion, *C. truncatum* uses the strategy of subcuticular intramural colonization in leaf and fruit of papaya Maradol; through this process,

the cutinase gene was overexpressed in the necrotrophic state; quitin synthase gene in the germination and penetration states and, β -1-3 glucan synthase gene during germination, penetration and necrotrophic state corresponding to the initial and final stages of the infection process.

Key words: *C. truncatum*, papaya, subcuticular intramural, cutinase, β -1-3 glucan synthase, quitin synthase

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

México es uno de los principales países productores de papaya a nivel mundial (FAO, 2017); cultivando especialmente la variedad Maradol, la cual se destina para consumo nacional e internacional. No obstante, la producción de papaya es afectada por enfermedades poscosecha ocasionadas principalmente por hongos.

Dentro de las enfermedades ocasionadas por hongos, la antracnosis es considerada la enfermedad poscosecha más importante en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Dickman, 1994); en México, se encuentra distribuida a nivel pre y poscosecha, ocasionando pérdidas superiores al 50% (Torres-Calzada et al., 2012). Hasta el año 2008, la antracnosis en papaya fue asociada solamente al hongo *Colletotrichum gloeosporioides*; sin embargo, también se ha identificado por primera vez en México a *Colletotrichum truncatum* (sinónimo *Colletotrichum capsici*) (Damm et al., 2009; Mahmodi et al., 2014) como agente causal de esta enfermedad (Tapia-Tussell et al., 2008; Torres-Calzada et al., 2011).

Debido a la reciente asociación de *C. truncatum* como agente causal de antracnosis en papaya, se desconoce el proceso de patogenicidad de este patógeno. No obstante, el proceso de infección de *C. truncatum* en otros hospedantes involucra principalmente una colonización intramural subcuticular como estrategia de infección y la producción de enzimas (Cutinasa, Poligalacturonasa, Pectato liasa y Pectin liasa) durante la fase necrotrófica

(Roberts y Snow, 1984; Ettinger et al., 1987; Agrios, 2005; Kramer-Haimovich et al., 2006).

Aunque se ha reportado el proceso de infección de *C. truncatum* en distintos hospedantes, son escasos los estudios a nivel molecular que involucran la expresión de genes relacionados con el mecanismo de patogenicidad. No obstante, se han reportado genes relacionados a la fase de pre infección (*CUT1*) en la cual está involucrado el evento de penetración (Auyong et al., 2015), así como genes relacionados a la colonización del patógeno en la fase necrótropa (*CHS1* y *GLS1*) en diversas especies del género *Colletotrichum* (Werner et al., 2007; Oliveira-García et al. 2013).

Debido a que *C. truncatum* recientemente se asoció a antracnosis en papaya (Tapia-Tussell et al., 2008; Rojo, 2013), aún es escasa la información de su proceso de patogénesis en este fruto así como los genes relacionados a patogenicidad. La generación de conocimiento respecto a la patogénesis de *C. truncatum* en papaya, contribuirá a mejorar las estrategias de control del patógeno, puesto que se ha caracterizado como una especie resistente a los fungicidas tales como azoxystrobin y tiabendazol (Torres-Calzada et al., 2015); por lo tanto, el objetivo de este trabajo es describir el mecanismo de patogenicidad de *C. truncatum* en frutos de papaya Maradol mediante histopatología y técnicas moleculares.

Esquema de Investigación

La presente tesis es dividida por capítulos; el capítulo I (introducción general) comprende una breve introducción y un esquema de la investigación, la cual muestra una perspectiva general de la estructura de esta investigación que se

presenta en la Figura 1. El capítulo II (problema de investigación) comprende los antecedentes relacionados con el género de hongos fitopatógenos *Colletotrichum* spp., en especial la especie *C. truncatum*, causante de antracnosis en el cultivo de papaya; así como, el desarrollo de la enfermedad, el mecanismo de patogenicidad, las estrategias generales de infección, y los genes relacionados a patogenicidad. El capítulo III, comprende una revisión acerca del estado actual de *Colletotrichum* en México; así como su taxonomía, caracterización, especies descritas a nivel morfológico y molecular, patógenesis y control.

El capítulo IV, aborda la investigación para dar respuesta a la primera pregunta de investigación; y el capítulo V, para dar respuesta a la segunda pregunta de investigación; ambos comprenden un estudio básico-descriptivo del proceso de infección y cambios estructurales en tejido del hospedante, durante la infección de *C. truncatum* en frutos y hojas de papaya Maradol, respectivamente. El capítulo VI aborda la tercera pregunta de investigación que comprende un estudio básico-experimental enfocado a determinar los niveles de expresión de los genes relacionados a patogenicidad (*CUT1*, *CHS1* y *GLS1*) de *C. truncatum* en hojas de papaya Maradol. Finalmente, el capítulo VII presenta los principales hallazgos y las conclusiones que se generaron con la presente investigación.

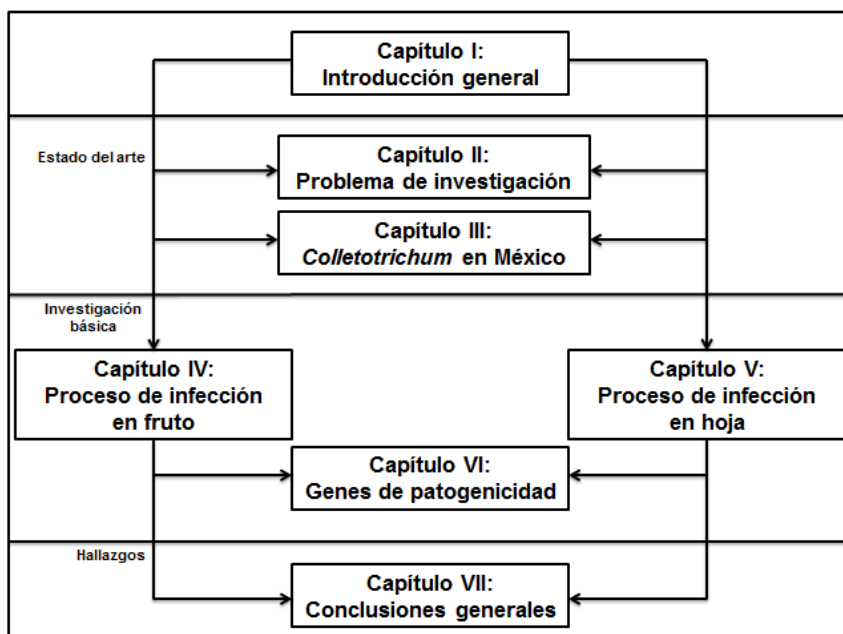


Figura 1. Estructura de la tesis.

Referencias

Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. Quinta edición. Editorial Elsevier. Academic. Pp. 388-592.

Auyong A. S. M., Ford R. and Taylor P. W. J. 2015. The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. Plant Pathology & Microbiology 6:259. Barnett H. y Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta edición. Editorial APS. Minnesota, USA. Pp 59-197.

Daam U., Woudenberg J., Cannon P. and Crous P. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Diversity 39:45-87.

Dickman M. B. 1994. Anthracnose. En: R. C. Ploetz, G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach and H. D. Ohr (eds.). Compendium of tropical fruit diseases. The American Phytopathological Society press, Minnesota, 58–59 p.

Ettinger W. F., Thukral S. K. and Kolattukudy P. E. 1987. Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. Biochemistry 26:7883-7892.

Food and Agriculture Organization (FAO), 2017. Estadísticas. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Consultado el 6 de marzo de 2017.

Kramer-Haimovich H., Servi E., Katan T., Rollins J., Okon Y. and Prusky D. 2006. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1034-1039.

Mahmodi F., Kadir J.B., Puteh A., Pourdard S.S., Nasehi A. and Soleimani N. 2014. Genetic diversity and differentiation of *Colletotrichum* spp. isolates associated with leguminosae using multigene loci, RAPD and ISSR. *The Plant Pathology Journal* 30:10-24.

Oliveira-García E. and Deising H. B. 2013. Infection structure-specific expression of β -1-3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of β -glucan-triggered immunity in maize. *The Plant Cell* 25:2356-2378.

Roberts R. G. and Snow J. P. 1984. Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. *Phytopathology* 74:390-397.

Rojó B. I. 2013. *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum capsici* asociadas a pudrición de pedúnculo y antracnosis en frutos de papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Maestría. Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Culiacán, Sinaloa, México.

Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Cortes-Velázquez A., Lappe P., Larque-Saavedra A. and Perez-Brito D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatán peninsula. *Molecular Biotechnology* 40:293-298.

Torres-Calzada C., Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Martín-Mex R., Rojas-Herrera R., Higuera-Ciapara I. and Pérez-Brito D. 2011. A species-specific

polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*. *Molecular Biotechnology* 49:48-55.

Torres-Calzada C., Tapia-Tussell R., Higuera-Ciapara I. and Pérez-Brito D. 2012. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology* 135:67-79.

Torres-Calzada C., Tapia-Tussell R., Higuera-Ciapara I., Martin-Mex R., Nexticapan - Garcez A. and Pérez - Brito D. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and molecular characterization of thiabendazole-resistant isolates. *Plant Disease* 99:1590-1595.

Werner S., Sugui J.A., Steinberg G. and Deising H.B. 2007. A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1555-156.

CAPÍTULO II: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El Cultivo de Papaya

El árbol de papaya (*Carica papaya* L.) es un frutal popular; sus frutos se consumen a nivel mundial como fruta fresca o en productos procesados debido a su sabor y a sus propiedades nutraceuticas como por ejemplo: actividad antibacteriana, antifungica, antiinflamatoria, anticancerigena, entre otras (Milind y Gurditta, 2011). Debido a su demanda de consumo a nivel mundial, el cultivo de papaya es económicamente importante en países tropicales y subtropicales (Teixeira et al., 2007).

Producción

En el año 2014, los principales países productores de papaya fueron India (2, 853, 464 t), Brasil (1, 538, 518 t), Nigeria (741, 746 t), y México (701, 202 t), por lo que ocupó el cuarto lugar a nivel mundial en producción de papaya (FAO, 2017). Dentro de los países centroamericanos, en el año 2014, México ocupó el primer lugar en exportación de papaya hacia Estados Unidos con una exportación de 121,770 t de papaya seguido de países como Belice, Guatemala, República Dominicana y Brasil (Propapaya, 2017).

A nivel nacional, los principales estados productores de papaya son Oaxaca (23,654 t), Chiapas (10,872 t), Colima (8,939 t) y Veracruz (8,315 t). Las

variedades de papaya que se producen en México son: Amarilla, Hawaiana, Roja, Criolla y Maradol. Ésta última, es la variedad que más se produce en México (SIAP, 2017).

La variedad Maradol se siembra en mayor porcentaje en México, ya que es destinada para consumo nacional y para exportación. Esta variedad de origen cubano se caracteriza por presentar descendencia compuesta por plantas hermafroditas y plantas femeninas que producen frutas alargadas y frutas redondas, respectivamente. El fruto presenta color externo amarillo anaranjado brillante y color interno rojo salmón. Su peso oscila entre 1.5 y 2.6 kg (Solórzano, 2002).

La producción de papaya es afectada por enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias, virus, nematodos, entre otros (Teixeira et al., 2007). Las enfermedades en pre y poscosecha ocasionan una reducción en la producción y calidad de mercado de papaya. Las pérdidas a nivel poscosecha se generan principalmente durante el transporte y almacenamiento de los frutos (Álvarez y Nishijima, 1987).

Pérdidas a Nivel Poscosecha

Los frutos de papaya, al igual que otras frutas y hortalizas, son severamente afectados por diversas enfermedades durante su conservación y comercialización (Mulkay et al., 2010). Las enfermedades poscosecha en papaya son importantes porque afectan la calidad y en algunos casos destruyen al fruto en su totalidad (Bernal, 1997), provocando pérdidas poscosecha que fluctúan entre 1 a 93% (Álvarez y Nishijima, 1987).

La principal enfermedad poscosecha en papaya cultivada en regiones tropicales y subtropicales del mundo, es antracnosis (Dickman, 1994). En México, durante

los últimos cinco años, la presencia de antracnosis a nivel pre y poscosecha, se ha incrementado incluso después de aplicar fungicidas por lo que las pérdidas son superiores al 50% (Torres-Calzada et al., 2012).

Rango de Hospedantes de Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad que afecta a numerosos cultivos y plantas ornamentales. Algunos ejemplos de hospedantes afectados son: papaya, chile, soya, frijol, cacahuete, mango, aguacate, cebolla, uva, algodón, fresa, frambuesa, café, maracuyá, limonium, peperomia, entre otros (Chau y Álvarez, 1983; Roberts y Snow, 1984; O'Connell et al., 1993; Damm, 2009; Hang et al., 2010; Mulkay et al., 2010); esta enfermedad es causada por varias especies del género *Colletotrichum* (Agrios, 2005).

Género *Colletotrichum*

Colletotrichum es un género de hongos que se encuentra dentro del grupo de hongos asexuales (Deuteromicetos) los cuales pertenecen al Phylum Ascomycota; se caracterizan por presentar acérvulos separados en forma de disco o cojín, cerosos, subepidermales que emergen de la planta huésped, típicamente contienen setas o espinas negras en los bordes o entre los conidióforos; los conidióforos son simples, elongados; las conidias son hialinas, ovoides u oblongas (Fig. 2) (Barnett y Hunter, 1998).

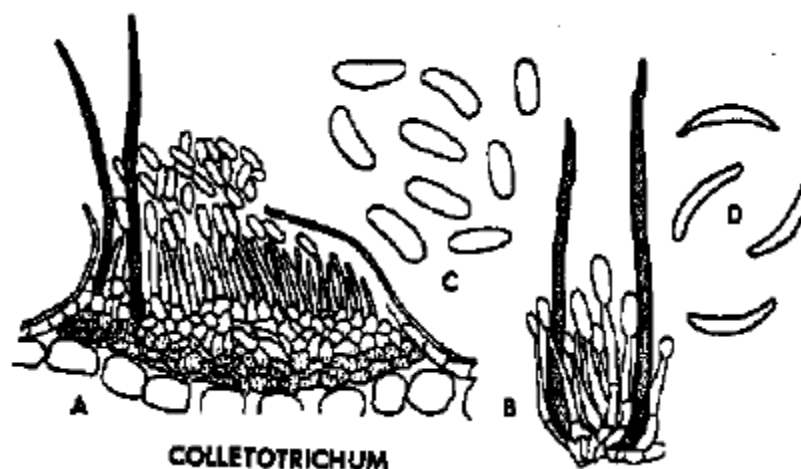


Figura 2. Características morfológicas del género *Colletotrichum*. A) Acérvulo; B) Conidióforo; C y D) Conidios (Barnett y Hunter, 1998).

Desarrollo de Antracnosis

El inóculo del microorganismo, como lo son micelio y esporas, sobrevive en tallos, hojas y frutos de la mayoría de los hospedantes anuales afectados y en cánceres de los hospedantes perennes. Las ascosporas o conidios producidos por el micelio que sobrevive a la primavera causan infecciones primarias. Los conidios causan infecciones secundarias durante toda la temporada, siempre y cuando la temperatura y la humedad sean favorables para el patógeno. Los tubos germinativos penetran directamente en el tejido. El micelio crece intercelularmente y puede permanecer latente por algún tiempo antes de que las células del huésped comiencen a colapsar y morir. Posteriormente, el micelio produce acérvulos justo debajo de la cutícula. Los acérvulos emergen y rompen la cutícula liberando conidios que causan más infecciones (Fig. 3). El patógeno en frutos jóvenes generalmente permanece latente hasta que el fruto madura, momento en el que las infecciones se desarrollan plenamente (Agrios, 2005).

El hongo es favorecido por la alta temperatura y el clima húmedo o humedad relativa alta. Los conidios son liberados y se dispersan solo cuando los acérvulos están húmedos y se propagan generalmente por salpicaduras debidas a la lluvia o al entrar en contacto con los animales, herramientas, etc. Los conidios germinan solamente en presencia de agua y el tubo germinativo penetra directamente en los tejidos del hospedante. Al principio, las hifas crecen rápidamente, intercelularmente e intracelularmente, pero causan pocos o ningún síntoma, ya que el patógeno permanece latente en frutos inmaduros en campo (Dickman, 1994). Cuando la fruta comienza a madurar, el hongo activa su metabolismo y aparecen los síntomas. Existe una considerable variabilidad respecto a los huéspedes atacados por *Colletotrichum* spp., lo que implica el desarrollo de diferentes estrategias de infección por parte del patógeno (Agrios, 2005).

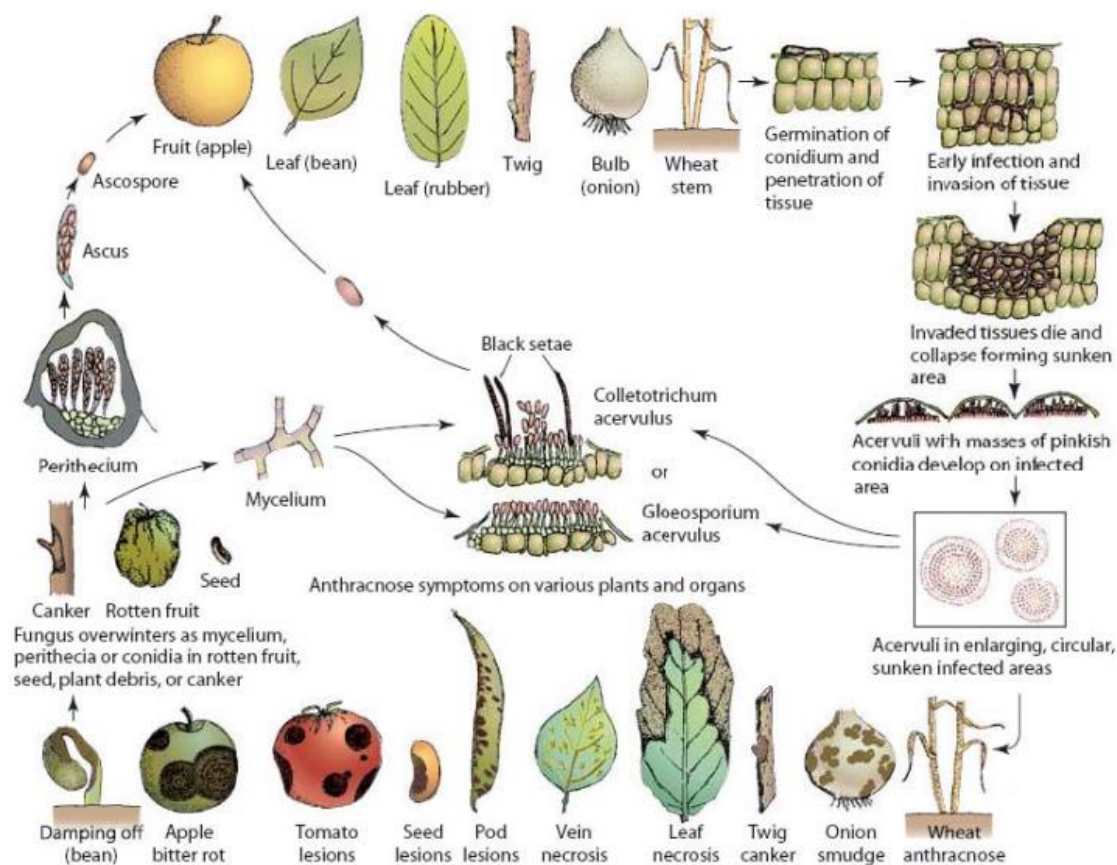


Figura 3. Ciclo de vida de la enfermedad de antracnosis causada por *Glomerella cingulata* y su anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides* (Agrios, 2005).

Mecanismo de Infección de *Colletotrichum* spp.

Durante el proceso de patogenicidad de especies de *Colletotrichum* se desarrolla una serie de eventos como la adhesión al huésped, germinación, formación del apresorio, penetración y nutrición; este último, involucra el desarrollo hemibiótrofo o necrótrofo (Fig. 4). En la actualidad se han estudiado los eventos involucrados en la diferenciación de las estructuras de infección de *Colletotrichum* spp. así como la interacción planta-patógeno (Perfect et al., 1999; Huser, 2008).

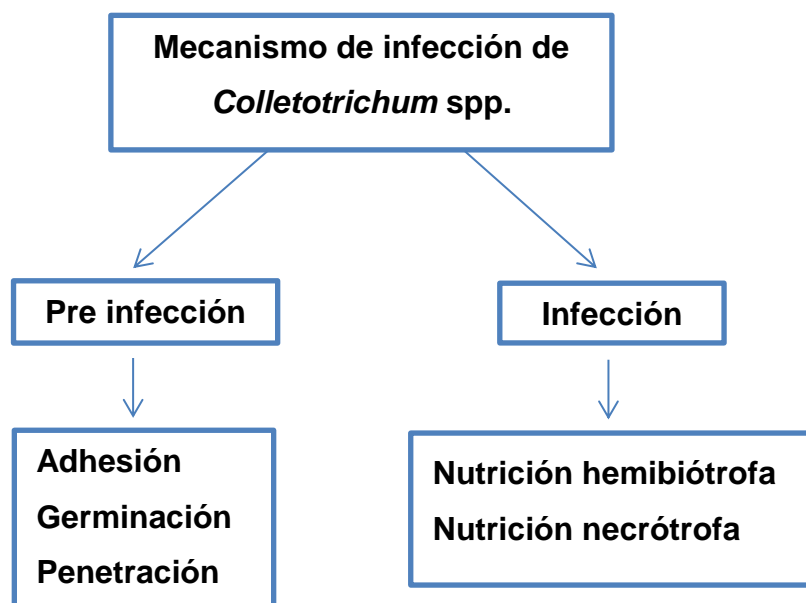


Figura 4. Etapas generales del mecanismo de infección de *Colletotrichum* spp.

Adhesión

La adhesión de esporas a la planta huésped es crucial en la interacción planta-patógeno. Los conidios de *C. graminicola* son producidos en acérvulos incrustados en una matriz hidrosoluble compuesta de polisacáridos y proteínas, probablemente para proteger a los conidios contra la desecación (Nicholson y Moraes, 1980). Durante las etapas iniciales de infección de *C. gloeosporioides* en aguacate se detectó una capa mucilaginosa alrededor de los conidios, lo que facilita su adhesión a la superficie del fruto (Rodríguez-López et al., 2013). En *C. lindemuthianum*, la capa de los conidios tiene una estructura esponjosa y porosa. La capa está compuesta por glicoproteínas; no obstante carece de los principales polisacáridos de la pared celular como quitina y β -1,3-glucanos (O'Connell et al., 2000).

La fijación inicial de los conidios de *Colletotrichum* spp. implica interacciones hidrofóbicas. La adhesión de los conidios de *C. musae* y *C. graminicola* se inhibió después del tratamiento con una enzima proteolítica, lo que sugiere que para estas especies se requieren proteínas preformadas en la superficie de las esporas para su unión inicial. Además de estas interacciones hidrófobas pasivas que proporcionan una rápida adhesión, *C. lindemuthianum*, *C. musae* y *C. graminicola* parecen requerir metabolismo activo, incluyendo la síntesis de proteínas, lo que sugiere una segunda fase de adhesión, que pueden servir para consolidar la unión hidrófoba inicial (Young y Kauss, 1984; Sela-Buurlage et al., 1991). En *C. gloeosporioides*, la segunda fase de adhesión es correlacionada con la liberación de un exudado de proteínas, el cual proviene de la espora y se extiende sobre el sustrato (O'Connell et al., 2000).

La adhesión de tubos germinativos y apresorios a las superficies, es generalmente más fuerte que la adhesión de esporas, debido a la proporción de una base sólida para la penetración. Fimbrias en forma de cabello de hasta 6 μ m de largo están presentes en las superficies de tubos germinativos y

apresorios de *Colletotrichum* spp., se sugiere que los componentes de la matriz extracelular secretados por tubos germinativos y apresorios son responsables de la adhesión (Pain et al., 1996).

Germinación

Las esporas de *Colletotrichum* spp. detectan señales físicas y químicas de la superficie de la planta para desencadenar la germinación y diferenciación de apresorios en aguacate. La germinación de esporas y la formación del apresorio de *C. gloeosporioides* son activados selectivamente por la cera de la superficie del huésped. La señal es específica ya que las ceras de otras plantas no pueden sustituir a la cera de aguacate (Rodríguez-López et al., 2009).

Por otra parte, el etileno, hormona de la maduración de los frutos, induce la germinación y formación del apresorio en patógenos que atacan a frutos climatéricos como *C. gloeosporioides* y *C. musae* pero no en especies de *Colletotrichum* que infectan frutos no climatéricos (*C. fragariae*, *C. acutatum*, entre otras). Por lo tanto, las esporas germinan y penetran después de activarse por la señal de la cera del huésped, pero permanecen latentes hasta que el fruto madura, es entonces cuando puede ocurrir una infección (Kolattukudy et al., 1995).

Para *C. gloeosporioides*, el contacto con una superficie dura es necesario para las señales químicas así como para la transcripción de calmodulina (Liu y Kolattukudy, 1998), la cual forma parte de la vía de señalización y es necesaria para la diferenciación de estructuras de infección (Perfect et al., 1999). Por otro lado, en *C. graminicola* la matriz hidrosoluble de esporas posiblemente incrementa la eficiencia de la germinación y penetración a través de actividad enzimática (Nicholson y Moraes, 1980).

Penetración

Las especies de *Colletotrichum* penetran la superficie de su huésped en base a fuerza mecánica y actividad enzimática. La fuerza mecánica es generada por una estructura de infección especializada denominada apresorio, la cual es formada en el extremo del tubo germinativo de algunas especies. En la mayoría de las especies, el apresorio posee pigmentación oscura debido a la capa de melanina en su pared celular. La melanina protege al apresorio contra daños ocasionados por el ambiente, tales como la radiación ultravioleta, lo cual contribuye a la virulencia de los hongos patógenos (Jacobson, 2000; Eisenman y Casadevall, 2012).

La penetración de la cutícula y la pared celular de la planta por medio de los apresorios probablemente implica una combinación de fuerza mecánica producida por la presión alta de la turgencia y la degradación enzimática (Perfect et al., 1999). En los apresorios se genera presión osmótica necesaria para la penetración mecánica por la clavija de penetración en la superficie (Huser, 2008).

Por otra parte, las especies de *Colletotrichum* utilizan la degradación enzimática durante la penetración a su huésped (Perfect et al., 1999). *C. gloeosporioides* utiliza pectato liasa para degradar pectinas presentes en la pared celular del huésped y cutinasa para degradar la cutícula del mismo (Kolattuduky, 2009).

La primera barrera de protección de las plantas contra el ingreso de patógenos es la cutícula, la cual está compuesta de cutina, ácidos grasos y lípidos denominados ceras. La enzima que degrada la cutícula es la cutinasa, la producción de esta enzima es estimulada por ácidos grasos presentes en la cera (Kolattuduky, 1985). El papel de la cutinasa en la penetración de la cutícula ha sido analizado en diversas especies de *Colletotrichum*. Varios mutantes de

C. gloeosporioides deficientes de cutinasa se compararon con respecto a su patogenicidad en frutos de papaya intactos o heridos mecánicamente (Dickman y Patil, 1986). Los mutantes resultaron altamente patógenos cuando los frutos de papaya fueron heridos en su superficie ya sea artificialmente o tratados antes de la inoculación con cutinasa purificada; sin embargo, no se produjo la enfermedad en los frutos de papaya intactos donde la cutícula relativamente gruesa tenía que ser penetrada (Dickman et al., 1982).

Nutrición

Durante la colonización de la planta hospedera, las especies de *Colletotrichum* utilizan dos principales estrategias de infección que se relacionan con el modo de nutrición: hemibiotrófico o biótrofo facultativo y necrótrofo (Perfect et al., 1999). En el modo de nutrición hemibiotrófico, inicialmente los nutrientes son obtenidos de células vivas del huésped antes de utilizar el modo necrótrofo; y necrótrofo intramural subcuticular, donde los nutrientes son obtenidos de células muertas del hospedante destruidas por el hongo (Mendgen y Hahn, 2002).

Desarrollo Hemibiotrófico. Para utilizar a las plantas como sustratos vivos, los hongos hemibiotróficos han evolucionado para formar estructuras de infección tales como apresorios, hifas de penetración e hifas de infección para invadir con daño mínimo a las células hospederas. Los hongos hemibiotrófos poseen estructuras altamente desarrolladas, su actividad secretora es limitada, en especial las enzimas líticas. Su pared celular contiene carbohidratos y proteínas que la separan de las membranas plasmáticas vegetales y mantienen la supresión de defensa del huésped (Mendgen y Hahn, 2002). El organismo modelo para el estudio de este tipo de nutrición es el organismo hemibiotrófico *C. lindemuthianum*. Se han estudiado diversas glicoproteínas que forman parte de las estructuras de

infección en la interacción con frijol (Perfect et al., 1999; Mendgen y Hahn, 2002).

Desarrollo Necrotrófico. Los organismos necrótrofos obtienen sus nutrientes poco después de la penetración, generalmente con ayuda de enzimas que ocasionan muerte al huésped (Huser, 2008). La producción de enzimas pectolíticas extracelulares por patógenos es regulada por la disponibilidad del polímero pectina y las unidades de galacturonano liberados. Dentro de las enzimas pectinolíticas se encuentran poligalacturonasas, las cuales dividen la cadena péctica mediante la adición de una molécula de agua e hidrolizan la vinculación entre dos moléculas de galacturonanos. La pectin liasa divide la cadena mediante la eliminación de una molécula de agua de la vinculación; por lo tanto, rompe y libera los productos con un doble enlace insaturado. Las poligalacturonasas y las pectin liasas pueden ser de dos tipos, rompen la cadena de pectina en sitios al azar (endopectinasas) y liberan cadenas más cortas, o rompen sólo el terminal de vinculación (exopectinasas) de la cadena y liberan unidades individuales de galacturonano (Agrios, 2005).

En *Colletotrichum*, la producción de pectato liasa es un factor clave de virulencia durante el desarrollo de la enfermedad. La enzima pectato liasa rompe los enlaces glicosídicos α (1-4) del ácido poligalacturónico (componente principal de la pectina de la pared celular y de la lámina media vegetal), próximos a un grupo metil éster, para ello requiere iones de calcio (Collmer y Keen, 1986; Martínez, 2012). La cantidad y la actividad de la enzima aumentan el pH en el sitio de infección de 7.5 a 8. El hongo mantiene el pH alto en la zona de la infección mediante la secreción de amoníaco (Kramer-Haimovich et al., 2006).

Las enzimas pécticas se producen durante la germinación de las esporas y, al parecer, actúan en conjunto con cutinasas para ayudar en la penetración del huésped. El resultado de la degradación de pectina es el debilitamiento de las paredes celulares, esto conduce a la maceración del tejido; es decir, al ablandamiento y la pérdida de coherencia de los tejidos vegetales y la separación de las células individuales que finalmente mueren. El debilitamiento de las paredes celulares y maceración de tejidos facilita la invasión inter o intracelular de los tejidos por el patógeno. La muerte celular resulta del debilitamiento de la pared celular primaria por las enzimas pectolíticas, la cual no puede soportar el protoplasto osmóticamente frágil (Agrios, 2005).

Estrategias de Infección

Las especies de *Colletotrichum* utilizan dos principales estrategias de infección: colonización hemibiotrófica intracelular o colonización intramural subcuticular. El estado inicial de infección es muy similar entre especies que utilizan las dos principales estrategias de infección; el conidio se adhiere y germina sobre la superficie de la planta, produce el tubo germinativo y luego forma el apresorio, con el cual penetra la cutícula directamente; no obstante el proceso de colonización es diferente en ambas estrategias (Perfect et al., 1999).

Colonización Hemibiotrófica Intracelular. La mayoría de las especies de *Colletotrichum* utilizan esta estrategia de infección aunque la longitud de la etapa biotrófica es variable o está ausente en muchas interacciones. Después de la penetración, las hifas de los hongos crecen dentro del lumen celular; es decir, crecen entre la membrana plasmática y la pared celular de las plantas. Después de la colonización de una o más células del huésped, las hifas que son biótroficas dan lugar a hifas necrotróficas secundarias

(Latunde-Dada et al., 1996; Mendgen y Hahn, 2002). Los hongos que utilizan la colonización hemibiotrófica intracelular se consideran hongos hemibiotróficos o biótrofos facultativos puesto que inicialmente se alimentan de las células vivas del huésped y después matan a estas células (Agrios, 2005).

En muchas interacciones no se conoce si el estado biótrofo está presente; sin embargo, es significativo que durante la colonización intracelular iniciada por el hongo, si es biótrofo o no, la planta hospedera no parece reconocer al patógeno y no hay respuesta de resistencia específica. Ejemplos en que ocurre la etapa biótrofa incluyen interacciones entre *C. truncatum* y chícharo (*Pisum sativum*), frijol (*Vicia faba*) y lenteja (*Lens culinaris*) (O'Connell et al., 1993; Latunde-Dada y Lucas, 2007); *C. destructivum* y frijol caupí (*Vigna unguiculata*) (Latunde-Dada et al., 1996); *C. lagenarium* y melón (*Benincasa hispida*) (Ge y Guest, 2011); *C. gloeosporioides* y guayaba (*Psidium guajava*) (Moraes et al., 2013).

La estrategia de infección que ocurre en la interacción entre *C. lindemuthianum* y frijol (*Phaseolus vulgaris*) es la más estudiada (Fig. 5a). Las esporas (S) germinan para formar una cúpula, y un apresorio melanizado (A) a partir del cual se desarrollan hifas de penetración. (1) Al entrar en las células epidérmicas del huésped (E), las hifas de penetración aumentan de tamaño para formar vesículas de infección (IV) y una hifa primaria amplia (PH), alrededor de la cual la membrana plasmática se invagina. La vesícula de infección y la hifa primaria están rodeadas por una matriz interfacial (ilustrado por diagonales). El protoplasto del huésped se mantiene vivo durante esta etapa biotrófica de la interacción. (2) La hifa primaria coloniza progresivamente nuevas células epidérmicas y mesófilas (MS), tornándose estrechos a medida que pasan a través de las paredes celulares. La matriz interfacial mantiene separada a la membrana plasmática vegetal de la pared celular fúngica y las nuevas células infectadas permanecen viables durante cierto tiempo. (3) Aproximadamente 48 h después de la penetración inicial se forman hifas necrotróficas secundarias

(SH), las cuales no están rodeadas por una capa de la matriz. En las células que contienen hifas primarias y secundarias la membrana plasmática vegetal y la matriz que rodean a la hifa primaria comienzan a desintegrarse. (4) La hifa secundaria secreta enzimas degradadoras de la pared celular, las cuales se expanden rápidamente y ocasionan lesiones necróticas (O'Connell, 1987).

Colonización Intramural Subcuticular. En la estrategia de infección intramural subcuticular, después de la penetración, el patógeno intramural subcuticular se desarrolla debajo de la cutícula formando una red de hifas intramural, antes de expandirse rápidamente por todo el tejido tanto con hifas inter e intracelulares, causando la muerte antes de la propagación del micelio. No hay etapa biotrófica detectable en estas interacciones. Ejemplos de patógenos que utilizan la estrategia intramural subcuticular incluyen a *C. gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) (Chau y Álvarez, 1983) y en mango (*Mangifera indica*) (Pandey et al., 2012); *C. truncatum* en algodón (*Gossypium hirsutum*) (Roberts y Snow, 1984) y en frijol caupí (*Vigna unguiculata*) (Pring et al. 1995) y *C. truncatum* en chile (*Capsicum annuum*) (Auyong et al., 2012; Ranathunge et al., 2012).

La estrategia de infección intramural subcuticular en *C. truncatum* ya se ha descrito (Fig. 5b): Las esporas (S) germinan para formar una cúpula y un apresorio melanizado (A) a partir del cual se desarrolla la hifa de penetración. (1) La cutícula del huésped es penetrada y las hifas fúngicas se extienden subcuticularmente dentro de las paredes de las células epidérmicas del huésped (E) que posteriormente mueren. (2) Durante etapas posteriores de infección, las hifas fúngicas penetran células epidérmicas y mesófilas (M) lo que conlleva a la posterior muerte del huésped (Perfect et al., 1999).

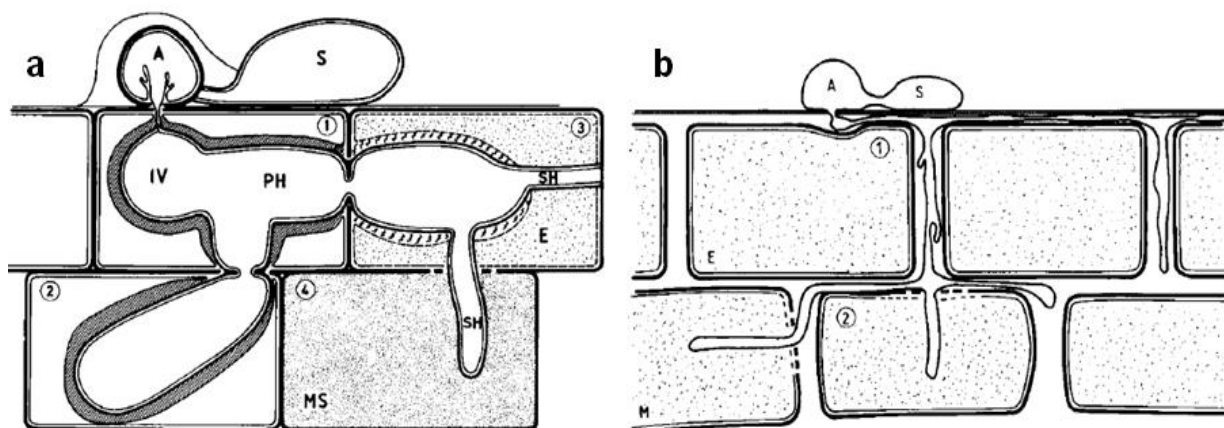


Figura 5. Estrategias de infección *Colletotrichum* spp. a) *C. lindemuthianum* en su interacción con frijol; b) *C. truncatum* un patógeno intramural subcuticular (Perfect et al., 1999).

Genes Relacionados a Patogenicidad de *Colletotrichum* spp.

Diversos enfoques moleculares se han empleado para estudiar los eventos involucrados en la diferenciación de estructuras de infección en *Colletotrichum* spp. y su interacción con el huésped. Técnicas como hibridación, clonación, PCR transcriptasa inversa, entre otras, se han utilizado para identificar a los genes que se expresan diferencialmente durante el proceso de infección de *Colletotrichum* spp. (Cuadro 1) (Perfect et al., 1999).

Durante la fase de pre infección se expresan diversos genes como *chip*, *cap*, *cut* y *pel*, entre otros. En *C. gloeosporioides* los genes que se expresan durante la etapa de pre infección se han identificado. Liu y Kolattukudy (1998) aislaron el gen *chip1* el cual se expresó durante la etapa de germinación de conidios de *C. gloeosporioides* sobre la superficie de aguacate. El gen *chip1* codifica para la enzima ubiquitina; mediante Northern blot se mostró que la máxima expresión del gen ocurrió después de 2 a 6 h; además, se demostró que la expresión del gen es inducida por el contacto con la superficie y ésta aumenta si se induce con etileno.

Cuadro 1. Genes en *Colletotrichum* expresados durante la infección (Perfect et al., 1999).

Etapa en la interacción en la cual el gen es expresado/ Función	<i>Colletotrichum</i> spp. a partir de los cuales se ha aislado el gen	Nombre del gen	Producto génico
Contacto de la espora con el sustrato	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>chip1</i>	Enzima ubiquitina-conjugada
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>cap3</i>	Metalotionina
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>cap5</i>	Metalotionina
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>cap20</i>	Proteína de la pared celular apresorial
Formación del apresorio	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>cap22</i>	Proteína de la pared celular apresorial
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>CUT1</i>	Cutinasa
	<i>C. lagenarium</i>	<i>scd1</i>	Scytalona deshidratasa
Síntesis de melanina	<i>C. lagenarium</i>	<i>pks1</i>	Policétido sintasa
	<i>C. lagenarium</i>	<i>thr1</i>	1,3,8-THN reductasa
Estado biótrofo	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>cih1</i>	Proteína relacionada-Biotrofia
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>pnlA</i>	Pectin liasa
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>pel</i>	Pectato liasa
Estado necrótrofo	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Clpg1</i>	Endo-poligalacturonasa
	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Clpg2</i>	Endo-poligalacturonasa
Señalización	<i>C. trifolii</i>	<i>TB3</i>	Serina/Treonina quinasa
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>cam</i>	Calmodulina
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>CaMK</i>	Calmodulina quinasa
Señalización/Patogenicidad	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>clk1</i>	Serina/Treonina quinasa
	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>gpd</i>	Gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa
Genes Housekeeping	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>tub1</i>	β -tubulina
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>tub2</i>	β -tubulina
Nutrición	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>gln</i>	Glutamato sintetasa

Por otra parte; con respecto a la enzima cutinasa, Ettinger et al. (1987) indujo la producción de cutinasa y determinó la secuencia de aminoácidos del gen *CUT1* que codifica para la enzima cutinasa en *C. gloeosporioides*. Además, Maciel et al. (2010) identificaron, mediante PCR punto final, el gen *cap20* en *C. gloeosporioides*, el cual codifica para una proteína de la pared del apresorio. La amplificación se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos específicos P1 y P2, y el tamaño del amplicón fue de aproximadamente 950 pb.

Aunado a ello, Hwang et al. (1995) identificaron y midieron el nivel de expresión del gen *cap20*, el cual codifica para una proteína de la pared del apresorio (CAP20) producido por *C. gloeosporioides* durante la etapa de pre infección en aguacate y tomate. La expresión de la proteína CAP20 se detectó mediante RT-PCR a partir de las primeras 2 h y se detectó después de 28 h.

Estos genes promueven la formación de estructuras de infección como el apresorio y degradación de cutícula (Fig. 6) (Kolattukudi et al., 2009). En *C. graminicola* se reportó el gen *GLS1* el cual codifica para la producción de β -1-3-glucan sintasa, esta enzima está implicada en el desarrollo de la pared celular del apresorio (Oliveira-García y Deising, 2013).

Por otra parte, diversos estudios reportan la identificación y expresión de genes durante la etapa de infección, principalmente genes que se asocian al estado de nutrición necrotrófico. Centis et al. (1997) caracterizaron al gen que codifica para la enzima endopoligalacturonasa (*Clpg1*) en *C. lindemuthianum* y midieron su nivel de expresión en etapa temprana del estado necrotrófico mediante clonación y PCR; el gen se expresó a partir de las 18 h.

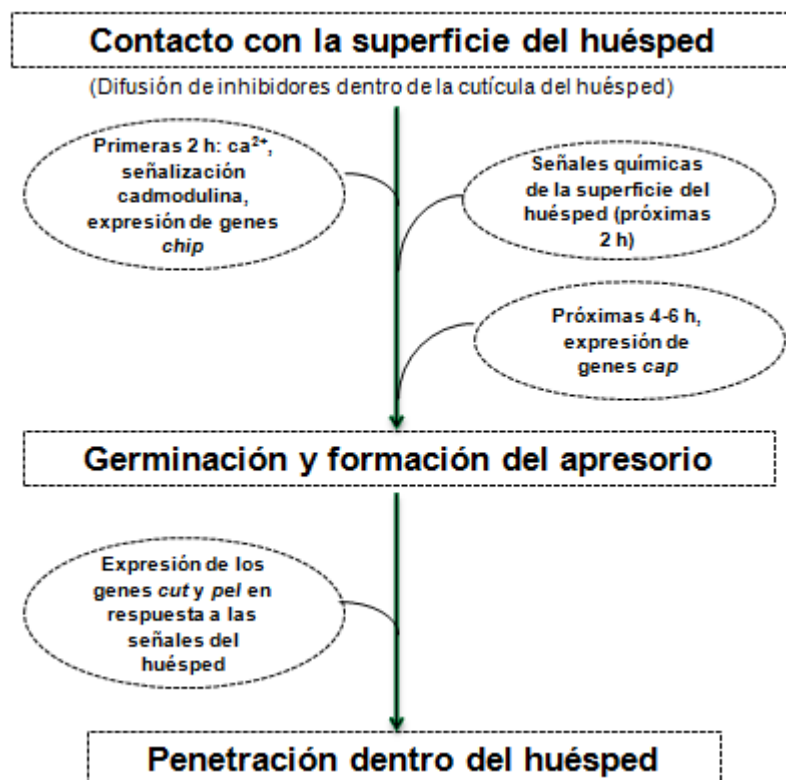


Figura 6. Esquema hipotético de los eventos moleculares durante el proceso de pre-infección en *Colletotrichum* spp.

Wei et al. (2002) caracterizaron los genes *pnl-1* y *pnl-2* que codifican para la enzima pectin liasa en *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* y midieron su expresión *in vitro* mediante RT-PCR. Concluyeron que el gen *pnl-1* se expresó a partir de las 72 h después de inoculación, lo que sugiere que se expresó en la fase necrotrófica; por otra parte el gen *pnl-2* se expresó a partir de las 48 h después de inoculación, lo que sugiere que se expresó en la fase biotrófica, a partir de este tiempo su expresión fue a nivel relativamente constante. Además, Kramer-Haimovich et al. (2006) determinaron la expresión del gen *pelB* que codifica para pectato liasa en *C. gloeosporioides* en presencia de amonio mediante qRT-PCR; el nivel de expresión se incrementó a las 24 h. Aunado a ello, Martínez (2012) evaluó los niveles de expresión *in vitro* de los genes *pg* y *pel* que codifican para las enzimas pectinolíticas poligalacturonasa y pectato liasa, respectivamente en *C. acutatum* mediante qRT-PCR; el gen *pel* presentó mayor expresión en el sexto y noveno día.

Por otro lado, durante la colonización de *C. graminicola* se expresan los genes *GLS1* y *CHS1*, los cuales codifican para las enzimas β -1-3-glucan sintasa y quitin sintasa, respectivamente. Ambos genes se sobreexpresan durante el desarrollo de apresorios e hifas secundarias de infección durante la fase necrótropa (Werner et al., 2007; Oliveira-García y Deising, 2013).

Antracnosis en Papaya

En papaya, la infección inicia en etapa temprana del fruto; no obstante, el patógeno permanece latente hasta que el fruto logra la fase climatérica. Una vez que el fruto comienza el proceso de maduración se presentan los síntomas de enfermedad (Álvarez y Nishijima, 1987). Los síntomas aparecen principalmente como manchas acuosas semicirculares o en anillos concéntricos, con hundimiento de coloración marrón a negro debido a la esporulación en masas del hongo. La pulpa debajo de la lesión es la primera en ablandarse; no obstante la pudrición es limitada en extensión ya que el diámetro es de 5 cm en promedio, el perímetro de la lesión se vuelve compacta y de coloración oscura (Dickman, 1994). Con ello, la fruta infectada es de menor calidad y gran parte de ella es inútil y se desecha (Agrios, 2005; López, 2010).

En México, los agentes causales de antracnosis en papaya son *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum truncatum*; en papaya Maradol y Sensation se observó la presencia de ambas especies ocasionando antracnosis (Rojo, 2013).

Estrategia de Infección

Colletotrichum gloeosporioides es el agente causal primario de antracnosis en papaya (Álvarez y Nishijima, 1987). *C. gloeosporioides* logra entrar en tejido

intacto de papaya disolviendo la capa cuticular del fruto. La disolución de la capa cuticular se debe a la producción de una enzima cutinolítica extracelular (cutinasa), por la cual logra degradar enzimáticamente los monómeros de cutina de la cutícula de papaya (Dickman et al., 1982).

El papel de la cutinasa se ha investigado en la penetración de la cutícula de papaya, varios mutantes deficientes de cutinasa de *C. gloeosporioides* se compararon con respecto a su patogenicidad en frutos de papaya intactos o heridos mecánicamente. Los mutantes causaron infección cuando la superficie de la fruta de papaya estaba herida artificialmente, pero la enfermedad no se produjo en papayas cuya cutícula estaba intacta.

Por otra parte, a nivel de laboratorio es posible detectar la producción de cutinasa por *C. gloeosporioides* al utilizar un medio de cultivo suplementado con cutina como fuente de carbono y observar un cambio de color en el medio de cultivo debido probablemente a una disminución del pH en el medio relacionado con monómeros de ácidos grasos del medio debido a la hidrólisis de cutina (Dickman y Patil, 1986). A nivel molecular, los genes que codifican para cutinasa se han aislado y secuenciado a partir de *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* (Ettinger et al., 1987).

El proceso de infección de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya se ha documentado como colonización subcuticular. Chau y Álvarez et al. (1983) estudiaron el proceso de infección de este patógeno en papaya variedad Kapoho Solo al inicio del climaterio utilizando microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Señalaron que *C. gloeosporioides* penetra en la cutícula de papaya por medio de una clavija de infección, la cual fue producida por un apresorio, éste fue observado 3-4 días después de la inoculación. Posteriormente, una hifa se formó entre la cutícula y la pared epidérmica, el micelio creció intra e intercelular. Las células infectadas se separaron y formaron una lesión hundida que fue visible 5 días después de la inoculación.

La ausencia de daño mecánico en la pared celular cercana al sitio de infección sugiere que la pared celular de papaya pudo haber sido disuelta enzimáticamente. La evidencia histopatológica indica que *C. gloeosporioides* forma un apresorio, una clavija de infección y una hifa subcuticular durante la penetración de papaya al inicio de la maduración.

Por otra parte, Casarrubias-Carrillo et al. (2002) también estudiaron el proceso de infección de *C. gloeosporioides* en frutos poscosecha en papaya variedad Maradol al inicio del climaterio en madurez fisiológica y de consumo mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica. Determinaron que la germinación de conidios ocurrió entre las 48 y 72 h después de la inoculación; la punta del tubo germinativo penetró directamente la cutícula a las 72 h después de la inoculación. Se logró establecer una diferencia entre los frutos de papaya a diferentes niveles de maduración, ya que en los frutos con maduración de consumo e inicio de climaterio, la infección fue rápida y las hifas intercelulares se presentaron 90 h después de la inoculación; mientras que, en frutos con maduración fisiológica, la invasión del tejido fue más lenta y ocurrió después de las 120 h. Ocho días después de la inoculación, la infección avanzó, lo que ocasionó colapso y separación celular, dando lugar a la formación de grandes cavidades en el mesocarpio, correspondientes a las lesiones hundidas típicas de antracnosis, finalmente se observó rompimiento de cutícula y formación de acérvulos y conidios.

Antracnosis Ocasionada por *Colletotrichum truncatum*

Colletotrichum truncatum es uno de los agentes causales de antracnosis y se ha reportado en distintas regiones del mundo como Japón, México, Estados Unidos y Trinidad y Tobago (Yaguchi et al., 1995; Tapia-Tussell et al., 2008; Tarnowski y Ploetz, 2010 y Rampersad, 2011). En México, la antracnosis ocasionada por *C. truncatum* es más severa que en el resto de países

afectados; *C. truncatum* ha presentado una incidencia de hasta un 40% produciendo infecciones en frutos de papaya lo que afecta la calidad de éstos (Torres-Calzada et al., 2012; Rampersad et al., 2013). Por otra parte, se han caracterizado cepas de *C. truncatum* aisladas de papaya como resistentes al fungicida químico Benomil (Rampersad, 2011).

Colletotrichum truncatum

De acuerdo a estudios moleculares *Colletotrichum truncatum* es sinónimo de *C. capsici* (Damm et al., 2009; Mahmodi et al., 2014). *C. truncatum* presenta crecimiento micelial de forma radial o irregular, con margen entero, de coloración gris a negro con masas conidiales producidas en anillos concéntricos (Torres-Calzada et al., 2012). También presenta acérvulos, conidióforos y setas abundantes formadas directamente sobre las hifas; las setas son de color café; los conidióforos son de color hialino a marrón pálido, septados, ramificados, densamente agrupados; los conidios son unicelulares, hialinos, de paredes lisas, sin septos, la parte central por lo general se encuentra ligeramente curvada con paredes paralelas, que termina abruptamente en base redonda y truncada, con contenido granular (Damm et al., 2009). Las medidas de los conidios son 22.8-23.8 x 3-3.02 μm (Torres-Calzada et al., 2012).

C. truncatum presenta distintas estrategias de infección de acuerdo a su hospedero (Perfect et al., 1999), *C. truncatum* es un patógeno hemibiotrófico intracelular en chícharo, soya, lenteja, entre otros (O'Connell et al. 1993; Manandhar et al. 1985; Wang, 2009). También se ha reportado a *C. truncatum* como un patógeno intramural subcuticular en chile (Auyong et al., 2012; Ranathunge et al., 2012). Por otra parte, *C. truncatum* es un patógeno intramural subcuticular en algodón (*Gossypium hirsutum*), frijol caupí (*Vigna unguiculata*) y betel (*Piper betle*) (Roberts y Snow, 1984; Pring et al., 1995).

Estrategia de Infección

La identificación de *C. truncatum* como agente causal de antracnosis en papaya en México es reciente (Tapia-Tussell et al., 2008), por lo tanto no se ha investigado su estrategia de infección en papaya; no obstante, existen reportes sobre la estrategia de infección en otros huéspedes.

C. truncatum, un patógeno intramural subcuticular, inicia la infección cuando la espora germina y se forma el apresorio melanizado en forma de cúpula o domo a partir del cual se desarrollan las hifas de penetración. La cutícula del huésped es invadida por las hifas, las cuales se extienden subcuticularmente dentro de las paredes de las células epidérmicas del huésped, posteriormente mueren. Durante las etapas posteriores de la infección fúngica las hifas penetran las células epidérmicas y mesófilas, causando la muerte de las células del huésped (Perfect et al., 1999).

Por otra parte, Roberts y Snow (1984) describieron el proceso de infección de *C. truncatum* en su interacción con algodón; observaron la germinación de conidios y la producción de apresorios en la cutícula cuatro horas después de la inoculación. La germinación de los conidios produjo un tubo germinativo en uno o en ambos extremos y/o en la parte media del conidio. El apresorio fue delimitado a partir del tubo germinativo por un septo. Algunos apresorios se formaron en la cutícula de células guardas estomatales, células epidérmicas y tricomas multicelulares. Además, después de la penetración de la cutícula del hospedante, proliferó durante varios días como una hifa subcuticular en las paredes de las células epidérmicas periclinales exteriores antes de penetrar entre las células epidérmicas en los tejidos adyacentes del algodón.

Pring et al. (1995) describieron el proceso de infección de *C. truncatum* en la leguminosa caupí (*Vigna unguiculata*). La infección inicial ocurrió después de la producción del apresorio. La hifa de infección penetró la cutícula e inició el crecimiento debajo de ella en las células periclinales de las células epidérmicas causando degradación excesiva de la pared. Subsecuentemente, la hifa creció y destruyó las paredes celulares de las células corticales subyacentes. Esto fue asociado con la muerte extensiva de células adyacentes, lo cual resultó en la producción de lesiones húmedas. Cuando el tejido estaba extensamente podrido, la hifa ingresó a las fibras esclerenquimatosas por crecimiento directo a través de sus paredes celulares. Además con la técnica de crio-barrido se logró observar vesículas y plasmatúbulos en la hifa de infección.

Ranathunge et al. (2012) describieron el proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en chile (*Capsicum* spp.). Durante la infección, las esporas germinaron poco después de la inoculación y se produjeron apresorios con o sin tubos germinales. Los poros de penetración aparecieron de 24 a 48 h después de inoculación; sin embargo, los síntomas no aparecieron en esta etapa de infección y la cutícula del fruto permaneció intacta. A los cuatro días después de inoculación, se desarrolló micelio a lo largo de las paredes de las células epidérmicas. A los seis días después de inoculación se observó la disolución de las paredes celulares del colénquima debido a la colonización del micelio. Posteriormente, se observó el hundimiento característico en la superficie del fruto debido a los tejidos infectados. Finalmente, acérvulos emergieron sobre la superficie del fruto a partir del séptimo día de inoculación. Las observaciones del proceso de infección revelaron la penetración directa de la cutícula y colonización intramural, endofítica y necrotrófica. Por otro lado, Auyong et al. (2012) describieron el proceso de infección de *C. truncatum* en chile mediante microscopía de fluorescencia. Después de la infección, las hifas colonizaron rápidamente el tejido del pericarpio, primero crecieron dentro de las paredes celulares de las células parenquimatosas de manera endofítica antes de infectar células y causar el colapso del tejido. Además se observó que las

hifas infectaron células epidérmicas del endocarpio de manera subcuticular intramural.

Por otra parte, O'Connell et al. (1993) realizaron un estudio histopatológico sobre la interacción de *C. truncatum* en hoja de chícharo (*Pisum sativum*). En esta interacción, *C. truncatum* formó apresorios para penetrar directamente la epidermis del hospedante. Una vez dentro, formó una hifa primaria de infección gruesa en las células epidérmicas; posteriormente, la hifa primaria dio lugar a delgadas hifas secundarias de infección, las cuales causaron degradación de las paredes celulares del hospedante, lo que sugiere que *C. truncatum* se comportó como hemibiótrofo, al presentarse un estado biótrofo durante 24 h antes de la presencia de las hifas secundarias de infección. Aunque se observaron esclerocios melanizados al final de la infección, no se observaron acérvulos.

Genes Relacionados a Patogenicidad en *C. truncatum*

Los estudios sobre la identificación y expresión de genes durante el proceso de patogénesis de *C. truncatum* son escasos. Ettinger et al. (1987) determinó la secuencia de aminoácidos del gen que codifica la enzima cutinasa; además, Maciel et al. (2010) amplificaron mediante PCR punto final el gen *cap20* en *C. truncatum* aislado de papaya el cual codifica para la proteína *cap20* involucrada en la penetración del apresorio durante el proceso de infección.

Bhadauria et al. (2011) analizaron marcadores de secuencia expresada (EST) en la interacción *C. truncatum*-lenteja; mediante análisis de secuencias génicas. Señalan que identificaron enzimas hidrolasas (β -glucanasas, pectato liasas, α -galactosidasas, endopoligalacturonasas, entre otras), proteínas asociadas al desarrollo celular del hongo (glicoproteína CIH1, proteína integral de

membrana), candidatos efectores (proteína extracelular, proteína en respuesta a elicitación) y otras proteínas (glutaminasa, peroxidasa). Algunas proteínas participan en el establecimiento de la interacción compatible con el hospedero. Además, Bhadauria et al. (2013) identificaron el gen efector ctNUDIX, el cual se expresa exclusivamente durante la fase biotrófica tardía (antes del cambio a necrotrofia) y provoca una respuesta hipersensible que ocasiona la muerte celular en hojas.

Por otra parte, Auyong et al. (2015) analizaron la expresión del gen *ctCUT1*, el cual codifica para la enzima cutinasa asociada a la penetración de *C. truncatum* en su interacción con chile. Ellos indican que observaron mayor expresión de este gen a las 24 horas después de inoculación en hojas de chile.

Preguntas de Investigación

1. ¿Cuál es la estrategia de infección que utiliza *C. truncatum* en fruto de papaya Maradol?
2. ¿Cuál es la estrategia de infección que utiliza *C. truncatum* en hoja de papaya Maradol?
3. ¿Cuál es el nivel de expresión temporal de los genes relacionados al proceso de infección de *C. truncatum* durante su interacción con hoja de papaya Maradol?

Problema de Investigación

Se realizó una investigación de tipo básica-descriptiva y experimental para determinar el mecanismo de infección así como los genes relacionados a patogenicidad de *C. truncatum* en fruto y hoja de papaya Maradol mediante técnicas histológicas y moleculares.

Justificación

En México, el cultivo de papaya presenta problemas fitosanitarios importantes dentro de los cuales destaca la antracnosis como enfermedad, la cual ocasiona pérdidas del 50% en pre y poscosecha aún después de utilizar fungicidas. El hongo fitopatógeno *C. truncatum* se encuentra en una incidencia del 40% en frutos de papaya, lo que afecta la calidad de éstos. La epidemiología y el mecanismo de infección son conocidos en la especie *C. gloeosporioides*; en contraste, es escasa la información relacionada a *C. truncatum* en frutos de papaya. Por lo cual, el conocer el proceso de infección aportará nuevo conocimiento sobre la patogénesis de *C. truncatum*, lo que contribuirá a comprender la epidemiología del patógeno y establecer futuras estrategias de control.

Objetivos

Objetivo General

Analizar el proceso de patogénesis de *Colletotrichum truncatum* en frutos y hojas de papaya Maradol.

Objetivos Específicos

1. Describir la estrategia de infección de *C. truncatum* en frutos de papaya Maradol en madurez comercial.
2. Describir la estrategia de infección de *C. truncatum* en hojas de papaya Maradol.
3. Determinar los niveles de expresión temporal de genes relacionados al proceso de infección de *C. truncatum* durante su interacción con hoja de papaya Maradol.

Referencias

Agrios G. N. 2005. Plant Pathology. Quinta edición. Editorial Elsevier. Academic. Pp. 388-592.

Álvarez A. and Nishijima W. 1987. Postharvest diseases of papaya. *Plant Disease* 71:681-686.

Auyong A. S. M., Ford R. and Taylor P. W. J. 2012. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. *Journal of Basic Microbiology* 52:372–382.

Auyong A. S. M., Ford R. and Taylor P. W. J. 2015. The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology & Microbiology* 6:259.

Barnett H. and Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta edición. Editorial APS. Minnesota, USA. Pp 59-197.

Bhadauria V., Banniza S., Vandenberg A., Selvaraj G. and Wei Y. 2011. ETS mining identifies proteins putatively secreted by the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. *BioMed Central Genomics*. 12:327.

Bhadauria V., Banniza S., Vandenberg A., Selvaraj G. and Wei Y. 2013. Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. *Eukaryotic Cell*. 12:2-11.

Bernal V. L. D. 1997. Efectos de tratamientos químicos e hidrotérmicos en el control de enfermedades poscosecha de papaya. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sinaloa. Pp. -6.

Casarrubias-Carrillo U., Cárdenas-Soriano E., Nieto-Ángel D. y Gutiérrez-Alonso G. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:88-93.

Centis S., Guillas I., Séjalon N., Esquerré-Tugayé M. T. and Dumas B. 1997. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of

CLPG2 y comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:769-775.

Chau K. F. and Álvarez A. M. 1983. A histological study of anthracnose on *Carica papaya*. *Phytopathology* 73:1113-1116.

Collmer A. and Keen N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 24:383-409.

Daam U., Woudenberg J., Cannon P. and Crous P. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39:45-87.

Dickman M. B. 1994. Anthracnose. En: R. C. Ploetz, G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach and H. D. Ohr (eds.). *Compendium of tropical fruit diseases*. The American Phytopathological Society press, Minnesota, 58–59 p.

Dickman M. B., Patil S. S. and Kolattukudy P. E. 1982. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. On *Carica papaya* L. *Physiological Plant Pathology* 20:333-347.

Dickman M. B. and Patil S. S. 1986. A rapid and sensitive plate assay for the detection of cutinase produced by plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 76:473-475.

Eisenman H.C. and Casadevall A. 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93:931-940.

Ettinger W. F., Thukral S. K. and Kolattukudy P. E. 1987. Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from Phytopathogenic fungi. *Biochemistry* 26:7883-7892.

Food and Agriculture Organization (FAO), 2017. Estadísticas. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. Consultado el 6 de marzo de 2017.

Ge Y. and Guest D. I. 2011. Light and scanning electron microscopy studies on the infection process of melon leaves by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76:67-74.

Hang P., Vinnere O., Olsson P. and Liljeroth E. 2010. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. *European Journal of Plant Pathology* 127:73-87.

Hwang C. S., Flaishman M. A. and Kolattukudy P. E. 1995. Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *The Plant Cell* 7:183-193.

Huser A. 2008. Identification of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colonia. Renania del Norte-Westfalia, Alemania. Pp. 3-27.

Jacobson E. S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical microbiology reviews* 13:708-717.

Kolattukudy P. E. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 23:223-250.

Kolattukudy P. E., Rogers L. M., Li D., Hwang C. and Flaishman M. A. 1995. Surface signaling in pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:4080-4087.

Kolattukudy P. E., Yeon-Ki K., Daoxin L., Zhi-Mei L. and Rogers L. 2009. Early molecular communication between *Colletotrichum gloeosporioides* and its host. En: Prusky D., Freeman S. y Dickman M. B. (eds.). *Colletotrichum* Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. APS press, Minnesota, 78-98 p.

Kramer-Haimovich H., Servi E., Katan T., Rollins J., Okon Y. and Prusky D. 2006. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1034-1039.

Latunde-Dada A. O., O'Connell R. J., Nash C., Pring R. J. Lucas J. A. and Bailey J. A. 1996. Infection process and identity of the hemibiotrophic anthracnose fungus (*Colletotrichum destructivum* O'Gara) from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Mycology Research* 100:1133-1141.

Latunde-Dada A. O. and Lucas J. A. 2007. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. *Plant Pathology* 56:437–447.

Liu Z. and Kolattukudy P. E. 1998. Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a ubiquitin-conjugating enzyme by yeast complementation. *Journal of Bacteriology* 180:3592-3597.

López N. M. C. 2010. Tratamientos postcosecha en el control de la antracnosis y calidad de frutos de papaya "Maradol". Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. Pp. 6-10.

Maciel D. B., Medeiros L.V., Medeiros V. V., Leao M. P.C., Camargo L. E.A. and Oliveira N.T. 2010. Amplification of the *cap20* pathogenicity gene and genetic characterization using different markers molecular in *Colletotrichum gloeosporioides* isolates. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:1255-1265.

Mahmodi F., Kadir J.B., Puteh A., Pouredad S.S., Nasehi A. and Soleimani N. 2014. Genetic diversity and differentiation of *Colletotrichum* spp. isolates associated with leguminosae using multigene loci, RAPD and ISSR. *The Plant Pathology Journal* 30:10-24.

Manandhar J. B., Kunwar I. K., Singh T., Hartman G. L. and Sinclair J. B. 1985. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. *Phytopathology* 75: 704-708.

Martínez G. A. P. 2012. Evaluación de los niveles de expresión “*in vitro*” de enzimas pectinolíticas del hongo *Colletotrichum acutatum* en presencia de inductores naturales provenientes del fruto de lulo (*Solanum quitoense* Lam). Avances para determinar sus niveles de transcripción. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Mendgen K. and Hahn M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* 7:352-356.

Milind P. and Gurditta B. 2011. Basketful benefits of papaya. *International Research Journal of Pharmacy* 2:6-12.

Moraes G. S. R., Tanaka O. F. A. and Junior M. N. S. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 35:657-664.

Mulkay T., Paumier A., Aranguren M. y Herrera O. 2010. Diagnóstico de las enfermedades fungosas de mayor incidencia durante la poscosecha de la papaya (*Carica papaya* L.), el mango (*Mangifera indica* L.) y el aguacate (*Persea americana* Miller) en tres localidades frutícolas de Cuba. *CitriFrut* 27:23-30.

Nicholson R. L. and Moraes W. B. C. 1980. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. *Phytopathology* 70:255–261.

O’Connell R. J. 1987. Absence of a specialised interface between infection hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. *Physiology Plant Pathology* 27:351-362.

O'Connell R. J., Uronu A. B., Waksman G., Nash C., Keon J. P. R. and Bailey J. A. 1993. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology* 42:774-783.

O'Connell R. J., Perfect S., Hughes B., Carzaniga R., Bailey J. and Green J. 2000. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. En: Prusky D., Freeman S. y Dickman M. B. (eds.). *Colletotrichum* Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. APS press, Minnesota, 57–77 p.

Oliveira-García E. and Deising H. B. 2013. Infection structure-specific expression of β -1-3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of β -glucan-triggered immunity in maize. *The Plant Cell* 25:2356-2378.

Pain N. A., Green J. R., Jones G. L. and O'Connell J. O. 1996. Composition and organization of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma* 190:119-130.

Pandey A., Pandey B. K., Muthukumar M., Yadava L. P. and Chauhan U. K. 2012. Histopathological study of infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc. on *Mangifera indica* L. *Plant Pathology Journal* 11:18-24.

Perfect S. E., Hughes H. B., O'Connell R. J. and Green J. R. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198.

Pring R. J., Nash C., Zakaria M. and Bailey J. A. 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46:137-152.

Propapaya, 2017. Situación actual de la papaya 2014. <http://www.propapaya.org/acerca-de-la-papaya/situacion-de-la-papaya>.

Consultado el 6 de marzo de 2017.

Rampersad S. N. 2011. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of papaya in Trinidad. *Plant Disease* 95:1244-1254.

Rampersad S. N., Perez-Brito D., Torres-Calzada C., Tapia-Tussell R. and Carrington C. 2013. Genetic structure and demographic history of *Colletotrichum gloeosporioides setu lato* and *C. truncatum* isolates from Trinidad and Mexico. *Biomedcentral Evolutionary Biology* 13:130

Ranathunge N. P., Mongkolporn O., Ford R. and Taylor P. W. J. 2012. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defense mechanisms. *Australasian Plant Pathology* 41:463-473.

Roberts R. G. and Snow J. P. 1984. Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. *Phytopathology* 74:390-397.

Rodríguez-López E. S., González-Prieto J.M. y Mayek-Pérez N. 2009. La infección *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:53-63.

Rodríguez-López E. S., Cárdenas-Soriano E., Hernández-Delgado S., Gutiérrez-Diez A. y Mayek-Pérez N. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35:898-905.

Royo B. I. 2013. *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum capsici* asociadas a pudrición de pedúnculo y antracnosis en frutos de papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Maestría. Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Culiacán, Sinaloa, México.

Sela-Buurlage M. B., Epstein L. and Rodriguez R. J. 1991. Adhesion o ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:345-352.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. Cultivos de interés. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do. Consultado el 6 de marzo de 2017.

Solórzano I. 2002. Manual Técnico: Buenas prácticas en papaya. Editorial OIRSA. El Salvador. Pág. 10.

Tapia-Tussell R., Quijano-Ramayo A., Cortes-Velázquez A., Lappe P., Larque-Saavedra A. and Perez-Brito D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatán peninsula. *Molecular Biotechnology* 40:293-298.

Tarnowski T. B. L. and Ploetz R. C. 2010. First report of *Colletotrichum capsici* causing postharvest anthracnose on papaya in South Florida. *Plant Disease* 94:1065.

Teixeira J., Rashid Z., Tan D., Sivakumar D., Gera A., Teixeira M. and Tennant P. 2007. Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1:43-73.

Torres-Calzada C., Tapia-Tussell R., Higuera-Ciapara I. and Pérez-Brito D. 2012. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.). *European Journal of Plant Pathology* 135:67-79.

Wang J. 2009. The infection process of *Colletotrichum truncatum* on lentil. Tesis de maestría en ciencias. Universidad de Saskatchewan, Saskatoon, Canadá.

Wei Y., Shih J., Li J. and Goodwin P. H. 2002. Two pectin lyase genes, *pnl-1* y *pnl-2*, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*. *Microbiology* 148:2149-2157.

Werner S., Sugui J.A., Steinberg G. and Deising H.B. 2007. A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1555-1567.

Yaguchi Y., Nakanishi Y., Saito T. and Nakamura S. 1995. Anthracnose of *Carica papaya* L. caused by *Colletotrichum capsici*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 61:222.

Young D.H. and Kauss H. 1984. Adhesion of *Colletotrichum lindemuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and to polystyrene. *Applied and environmental microbiology* 47:616-619.

CAPÍTULO III: PRIMER ARTÍCULO

SITUACIÓN ACTUAL DE *Colletotrichum* spp. EN MÉXICO: TAXONOMÍA, CARACTERIZACIÓN, PATOGÉNESIS Y CONTROL

CURRENT SITUATION OF *Colletotrichum* spp. IN MEXICO: TAXONOMY, CHARACTERIZATION, PATHOGENESIS AND CONTROL

Indira Rojo-Báez, Brando Álvarez-Rodríguez, Raymundo S. García-Estrada, Josefina León-Félix, Adriana Sañudo-Barajas, Raúl Allende-Molar* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación Culiacán. Carr. Culiacán-Eldorado km 5.5, Campo el Diez, CP. 80110, Culiacán, Sinaloa, México. (indira.rojo@estudiantes.ciad.mx, brando.alvarez@estudiantes.ciad.mx, rsgarcia@ciad.mx, ljosefina@ciad.mx, adriana@ciad.mx, rallende@ciad.mx)

*Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Artículo publicado en: Revista Mexicana de Fitopatología.

Rojo-Báez I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2017. Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. Revista Mexicana de Fitopatología 35. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1703-39>

Resumen. Las especies del género *Colletotrichum* son agentes causales de antracnosis en un amplio rango de hospedantes. De acuerdo con estudios taxonómicos, *Colletotrichum* se clasifica filogenéticamente en 9 clados; la identificación molecular de los complejos de especies se basa en distintas regiones genómicas conservadas. En México, se han reportado 46 especies de las cuales 28 se identificaron a nivel morfológico y 18 a nivel molecular. *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* son las principales especies reportadas que afectan a un mayor número de hospedantes como papaya, chile, mango, limón y aguacate, entre otros. Este rango amplio de hospedantes puede deberse a la habilidad del hongo de emplear diferentes estrategias de infección: colonización intramural subcuticular o colonización intracelular. Las estrategias de control en *Colletotrichum* spp. incluyen control físico, químico y biológico, entre otras. El objetivo de esta revisión consiste en describir el estado actual de las especies de *Colletotrichum* en México.

Palabras clave: Antracnosis, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, estrategias de infección.

Abstract. *Colletotrichum* species are causal agents of anthracnose in a wide host range. According to taxonomic studies, *Colletotrichum* is classified phylogenetically into nine clades; the molecular identification of especies complexes is based on different conserved genomic regions. In Mexico, forty-six *Colletotrichum* species have been reported, 28 were identified at morphological level and 18 at molecular level. The main species reported are *C. gloeosporioides* and *C. truncatum* as they affect a larger number of hosts such as papaya, chili, mango, lemon, avocado, among others. This wide host range may be because these species have different infection strategies according to the host: intramural sucuticular colonization or intracelular colonization. The control strategies in *Colletotrichum* spp. include physical, chemical and biological control, among others. The objective of this review is to know the status of *Colletotrichum* species in Mexico.

Keywords: Anthracnose, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, infection strategies.

Colletotrichum es un género de hongos fitopatógenos que ocasiona enfermedades como cánceres, pudriciones y principalmente antracnosis en diferentes hospedantes; se manifiesta en lesiones semicirculares con hundimientos en forma de anillos concéntricos (Fig. 7) (Hyde *et al.*, 2009a). A nivel mundial se reporta la antracnosis en frutas, hortalizas, cereales, plantas herbáceas, maderables y ornamentales, entre otras; sobre todo en zonas templadas y tropicales (Udayanga *et al.*, 2013).

Colletotrichum incluye más de 100 especies responsables de antracnosis en casi todos los cultivos destinados a la producción de alimentos, fibras y forrajes a nivel mundial, como por ejemplo *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, *C. graminicola*, *C. boninense*, entre otras (Crouch *et al.*, 2014). Debido a su importancia científica y económica, las especies de *Colletotrichum* ocuparon el octavo lugar en la clasificación mundial de patógenos de plantas (Dean *et al.*, 2012).

La antracnosis genera pérdidas importantes en pre y postcosecha ya que ocasionan una reducción en la calidad y cantidad de diversos cultivos. Las pérdidas pueden llegar hasta el 100 % dependiendo del patógeno y las condiciones climáticas (Landeró-Valenzuela *et al.*, 2016); por ejemplo, en el cultivo intensivo de papaya bajo manejo de fungicidas, la prevalencia de antracnosis en campo y en postcosecha ha provocado pérdidas superiores al 50 % (Torres-Calzada *et al.*, 2013).

La diversidad poblacional de *Colletotrichum* a partir de reportes previos es complicada por las limitaciones en cuanto a herramientas de identificación de especies ya que los métodos tradicionales se basaron en diferencias morfológicas que hoy en día se saben insuficientes e imprecisas (Hyde *et al.*, 2009b).

A pesar de que existe diversa información acerca de *Colletotrichum* spp., en México no existen publicaciones que describan a las especies de *Colletotrichum* que han sido estudiadas en el país, así como los hospedantes donde se han reportado causando daños. Por lo tanto, el objetivo de este

trabajo es describir la situación actual de *Colletotrichum* en México mediante una recopilación de resultados publicados respecto a taxonomía, identificación, especies reportadas, patogénesis y control.

TAXONOMÍA

Colletotrichum comprende el estado asexual (anamorfo) de *Glomerella* (teleomorfo), el cual pertenece al phylum Ascomycota, clase Hypocreomycetidae, orden Glomerellales, familia Glomerellaceae (Réblová *et al.* 2011). Glomerellaceae es una familia monotípica caracterizada por peritecios oscuros no estromáticos, ostiolos perifisados bien desarrollados, abundantes paráfisis de pared delgada. *Glomerella* inicialmente se ubicó en el orden Phyllacorales, pero algunas de sus características son claramente distintas a la de otros miembros: por ejemplo su falta de tejido estromático y sus anamorfos exclusivos de *Colletotrichum* (Zhang *et al.*, 2006).

Colletotrichum es un género confuso taxonómicamente, debido a que existe variación del nombre del género de acuerdo a su estado sexual; en el año 2012, los miembros de la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Colletotrichum* (ISTC) apoyaron el uso del término *Colletotrichum* sobre el de *Glomerella* derivado de su mayor uso en ciencias aplicadas; lo que dio la expectativa de generar menores cambios taxonómicos en las especies de ese género (Damm *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

La identidad de especies importantes de *Colletotrichum* aún requiere consideración y aunque, las técnicas moleculares y filogenéticas mejoran la precisión de los métodos morfológicos y bioquímicos tradicionales, se requiere un diagnóstico integral que brinde mayor robustez.

De acuerdo a análisis filogenéticos se han identificado complejos de especies dentro del género *Colletotrichum*, los cuales están clasificados en nueve clados principales: clado acutatum (comprende 29 especies) (Damm *et al.*, 2012a), clado boninense (27 especies) (Damm *et al.*, 2012b), clado destructivum (13 especies) (Damm *et al.*, 2014), clado gloeosporioides (22 especies) (Weir *et al.*, 2012), clado orbiculare (8 especies) (Damm *et al.*, 2013),

clado graminicola (13 especies), clado dematium (6 especies), clado spaethianum (5 especies) y clado truncatum (3 especies) (Cannon *et al.*, 2012; Udayanga *et al.*, 2013).

IDENTIFICACIÓN

Morfológica. Tradicionalmente, el género *Colletotrichum* se ha identificado mediante caracteres morfológicos que incluyen: tamaño y forma de conidios, y apresorios; presencia o ausencia de setas, esclerocios, acérvulos, estado teleomorfo; así como características culturales como por ejemplo color de la colonia, textura y tasa de crecimiento (Hyde *et al.*, 2009b). *C. truncatum* presenta conidios son unicelulares de tamaño 22.8 - 23.8 x 3 - 3.02 μm , hialinos, de paredes lisas, sin septos, la parte central por lo general se encuentra ligeramente curvada con paredes paralelas, que termina abruptamente en base redonda y truncada, con contenido granular (Fig. 8A); en contraste, *C. gloeosporioides* presenta conidios ovoides de tamaño 13.56 - 14.24 x 4 - 4.02 μm (Fig. 8B). Las colonias de *C. truncatum* son de forma circular o irregular, con margen entero, de coloración blanco a salmón o gris a negro con masas conidiales producidas en anillos concéntricos (Fig. 8C) y las de *C. gloeosporioides* muestran crecimiento micelial de forma radial, con margen entero u ondulado, generalmente de coloración blanco con masas conidiales de color anaranjado en el centro de la colonia (Fig. 8D). Por otra parte, *Colletotrichum* presenta distintos morfotipos, como por ejemplo margen circular, entero, coloración de micelio gris, con masas conidiales anaranjadas (Fig. 8E) (Torres-Calzada *et al.*, 2012).

De acuerdo con Barnett y Hunter (1998), *Colletotrichum* es un género que se caracteriza por presentar acérvulos separados en forma de disco o cojín, cerosos, subepidermales que emergen de la planta hospedante, típicamente contienen setas o espinas negras en los bordes o entre los conidióforos; los conidióforos son simples y elongados; los conidios son hialinos, ovoides u oblongos. No todas las especies de *Colletotrichum* tienen conidios ovoides u

oblongos, ya que existen especies con conidios curvados como por ejemplo *C. dematium* y *C. lineola* (Damm *et al.*, 2009).

Crouch *et al.* (2009a) consideran que la forma y tamaño de los conidios, al igual que en apresorios, son de poca utilidad taxonómica para caracterizar especies graminícolas. Las especies con características morfológicas similares pueden tener una considerable variación a nivel fisiológico y patogénico debido a las condiciones ambientales o de incubación, entre otras. Así mismo, las características morfológicas no son suficientes para un diagnóstico, puesto que existe gran variación en morfología del fenotipo entre especies bajo diferentes condiciones ambientales (Cai *et al.*, 2009). Para superar las deficiencias de la identificación tradicional, en la actualidad, el uso combinado de caracterización molecular en conjunto con el diagnóstico tradicional constituyen una técnica adecuada para el estudio de complejos en especies de *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2009b).

Molecular. Debido a las limitaciones de la identificación tradicional, el análisis de ácidos nucleicos se considera confiable para identificar especies de *Colletotrichum*; sin embargo, un inconveniente importante de la dependencia de una pequeña porción del genoma para comprender las relaciones filogenéticas entre cepas de *Colletotrichum* es el riesgo de crear árboles filogenéticos de genes en lugar de árboles filogenéticos de especies; por lo tanto, se ha empleado la filogenética de múltiples genes para caracterizar sistemáticamente relaciones entre especies de *Colletotrichum*, lo cual sirve como base para la identificación en un complejo de especies (Cai *et al.*, 2009).

En la actualidad se utilizan regiones génicas conservadas o códigos de barras genéticos para la identificación de especies fúngicas. La región más utilizada es el espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal nuclear (Schoch *et al.*, 2012). En *Colletotrichum* spp., además de la región ITS, para estudiar especies de *Colletotrichum* estrechamente relacionadas, se utilizan también regiones como: actina parcial (ACT), β -tubulina (TUB2), calmodulina (CAL), glutamina sintetasa (GS), quitina sintasa (CHS1), histamina (HIS3), liasa (APN2), región intergénica de *apn2* y MATI-2-1 (ApMat), y gliceraldehido 3-

fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Cai *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2014). La filogenie de múltiples genes se ha aplicado con éxito para resolver relaciones entre especies con conidios curvados en hospedantes herbáceos, ejemplo de ello son los nuevos taxos de especies *C. hanau*, *C. nicholsonii*, *C. paspali*, entre otras (Crouch *et al.*, 2009a).

Aunque la filogenia de genes múltiples es una forma precisa y confiable para el diagnóstico de *Colletotrichum* spp., no es tan eficiente ni económicamente viable; actualmente es poco práctico utilizar la filogenética múltiple para todas las especies, por lo que distintos grupos de investigación utilizan diferentes regiones génicas. La región ITS es la más ampliamente secuenciada; sin embargo, las secuencias de esta región no son totalmente confiables en cuanto a la discriminación entre especies de *Colletotrichum* (Cai *et al.*, 2009), ya que por ejemplo Crouch *et al.* (2009b) reportaron una tasa alta de errores de identificación (86 %) basada en la comparación de secuencias dentro del complejo de especies *C. graminicola*. Por otro lado, las secuencias ITS depositadas en bases de datos públicas (Genbank) pueden causar confusión puesto que se introducen secuencias con nombres erróneos y pueden comprender especies crípticas.

Por lo tanto, el estudio del genotipo incluye secuenciación para realizar una combinación de caracteres filogenéticos, mientras que el estudio fenotípico debe ampliarse en un sentido polifásico que incluya morfología, fisiología, patogenicidad, proceso de infección, características culturales y metabolitos secundarios (Cai *et al.*, 2009). Así, la identificación de *Colletotrichum* debe utilizar ambos estudios para establecer un diagnóstico confiable y eficaz.

ESPECIES DE *Colletotrichum* DESCRITAS EN MÉXICO

Diversas especies de *Colletotrichum* han sido reportadas como agentes causales de antracnosis en distintos hospedantes en México. Se han reportado 82 especies de *Colletotrichum* en plantas monocotiledóneas como maíz (*Zea mays*) (Álvarez, 1976), henequén (*Agave fourcroydes*) (Quijano-Ramayo *et al.*, 2002), sorgo (*Sorghum vulgare*) (Álvarez, 1976), y dicotiledóneas como plátano

(*Musa* spp.) (Marin *et al.*, 1996), fresa (*Fragaria chiloensis* var. *Ananassa*) (Fraire-Cordero *et al.*, 2003) y rosal (*Rosa* spp.) (Álvarez, 1976), entre otros.

Veintiocho especies se han descrito con base en la caracterización morfológica, de las cuales, 23 son anamórficas y cinco son teleomórficas (Cuadro 2). *C. gloeosporioides* es la especie más reportada de acuerdo al número de hospedantes. Las características morfológicas de *C. gloeosporioides* pueden variar incluso en el mismo hospedante; un claro ejemplo es el hallazgo de Torres-Calzada *et al.* (2013), quienes identificaron seis distintos morfotipos de *C. gloeosporioides* en papaya, éstos presentaron características culturales tales como crecimiento micelial de forma circular con margen entero u ondulado, de coloración blanca con masas conidiales de color naranja en el centro de la colonia o distribuidas en anillos concéntricos a lo largo de la colonia. Algunos morfotipos mostraron coloración oliva, gris oscuro a negro, con conidios de tamaño promedio de 13.56 - 14.24 x 4 - 4.02 μm .

Se han reportado 18 especies con base en caracterización molecular: 15 especies en estado anamorfo y tres en estado teleomorfo (Cuadro 3). En la mayoría de las especies, se realizó una identificación integral (morfológica y molecular), esta última se realizó con base en análisis de la región espaciadora interna transcrita (ITS); a pesar de que esta región del genoma no es totalmente confiable, es la más ampliamente utilizada debido a que esta región tiene una organización conservada en el genoma de todos los eucariotes (18S, 5.8S y 28S), se encuentra en unidades repetidas y tiene un gran número de copias, lo que facilita su amplificación; y hace que estas regiones sean útiles para el diseño de iniciadores. Por otro lado, estas regiones conservadas están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud, que son muy informativas y representan una huella genómica para cada especie (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2004).

En la actualidad, la identificación a nivel molecular con base en una sola región conservada es insuficiente. Generalmente se utilizan dos o más regiones; por ejemplo, para las especies *C. godetiae* y *C. karstii* se utilizaron las regiones ITS y GADPH (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2015; Velázquez-del Valle

et al., 2016) y para las especies *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. siamense* y *C. theobrominicola* las regiones: ACT, CAL, GAPDH, TUB2 e ITS (Cristóbal-Martínez *et al.*, 2017).

Las especies reportadas con mayor número de hospedantes son *C. truncatum* (6 hospedantes) y *C. gloeosporioides* (5 hospedantes) basado en la identificación inicial con la region ITS (iniciadores ITS1-ITS4) y posterior uso de CcapF-CcapR y Cglnt-ITS4, respectivamente (Torres-Calzada *et al.*, 2011b; Tapia-Tussell *et al.*, 2008).

PROCESO DE INFECCIÓN

Durante el proceso de patogenicidad; en especies de *Colletotrichum* se desarrollan eventos progresivos como la adhesión al hospedante, germinación (incluye la formación de tubos germinativos), penetración (formación de apresorios melanizados) y nutrición (colonización mediante hifas intracelulares e hifas secundarias de infección). En la actualidad se conocen los procesos involucrados en la diferenciación de las estructuras de infección de *Colletotrichum* spp. así como los medios de interacción planta-patógeno (Cannon *et al.*, 2012).

Las especies de *Colletotrichum* utilizan dos estrategias principales de infección: colonización hemibiotrófica intracelular o colonización intramural subcuticular. El estado inicial de infección es muy similar en ambas: el conidio se adhiere, germina sobre la superficie de la planta, produce el tubo germinativo y luego forma el apresorio melanizado con el cual penetra directamente la cutícula; sin embargo, el proceso de colonización es diferente en ambas estrategias (Perfect *et al.*, 1999).

Durante la colonización hemibiotrófica intracelular, al penetrar las células epidérmicas del hospedante, las hifas aumentan de tamaño, formando vesículas de infección y una hifa primaria amplia, alrededor de la cual se invagina la membrana plasmática. La vesícula de infección y la hifa primaria están rodeadas por una matriz interfacial, por lo que el protoplasto del hospedante se mantiene vivo durante esta etapa de la interacción;

posteriormente, la hifa primaria coloniza progresivamente nuevas células epidérmicas y mesófilas, a partir de las hifas primarias se forman hifas necrotróficas secundarias delgadas, las cuales se expanden rápidamente y degradan las paredes celulares mediante enzimas, lo que ocasionan lesiones necróticas (Perfect *et al.*, 1999).

En contraste, durante la estrategia de infección intramural subcuticular, después de la penetración, el patógeno se desarrolla debajo de la cutícula formando una red de hifas intramurales. Durante las etapas posteriores de infección, las hifas inter e intracelulares penetran células epidérmicas y mésofilas, lo que ocasiona la muerte del hospedante (Perfect *et al.*, 1999).

En México, los estudios del proceso de infección de *Colletotrichum* en su interacción con sus hospedantes son escasos y solo han reportado que las especies de *Colletotrichum* utilizan la estrategia intramural subcuticular y que el periodo en que ocurre la infección es distinto de acuerdo al hospedante. Estos estudios, a nivel histológico, es necesario complementarlos con estudios de expresión génica que se enfoquen en los genes relacionados a patogenicidad (Fig. 9). Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002) estudiaron el proceso de infección de *C. gloeosporioides* en su interacción con frutos de papaya. La germinación de conidios y penetración directa ocurrió entre las 48 y 72 h después de inoculación (hdi). La colonización mediante hifas intercelulares ocurrió entre las 90 y 120 hdi. Ocho días después de la inoculación ocurrió el colapso y la separación celular, así como el rompimiento de cutícula y formación de acérvulos y conidios, dando lugar a la formación de lesiones hundidas típicas de antracnosis, por lo que *C. gloeosporioides* en su interacción con papaya desarrolla una estrategia intramural subcuticular.

Por otro lado, Villanueva-Arce *et al.* (2006) estudiaron la patogénesis de *C. fragariae* en su interacción con frutos de chirimoya. Los conidios germinaron sobre la epidermis y tricomas de frutos inmaduros, la penetración fue directa a través de tricomas y células epidermales por medio de apresorios a las 24 hdi. La colonización del patógeno fue inter e intracelular sin etapa biótropa visible, después de la necrosis, se formaron acérvulos subcuticulares, completando el

ciclo de vida de *C. fragariae* a las 72 hdi, por lo que la estrategia de infección fue intramural subcuticular.

Por otra parte, Rodríguez-López *et al.* (2013) estudiaron el proceso de infección de *C. gloeosporioides* en su interacción con frutos de aguacate. La estrategia de infección fue colonización subcuticular intramural. No se detectó penetración directa por medio de apresorios; no obstante, se observó una capa mucilaginosa asociada a los tubos germinativos, la colonización fue intra e intercelularmente y la producción de acérvulos inició a partir de los doce días después de inoculación.

Rojo-Báez *et al.* (2016) estudiaron el proceso de infección de *C. truncatum* en su interacción con hojas de papaya y de chícharo. En ambos hospedantes, la penetración ocurrió de manera directa por medio de apresorios a las 20 hdi (Fig. 10A-B). En papaya, la colonización fue inter e intracelular (Fig. 10C-D); en contraste, en chícharo la colonización fue intracelular, se observaron hifas primarias de infección a las 36 hdi y durante el estado necrótrofo se observaron hifas secundarias a las 72 hdi. En ambos hospedantes se observaron acérvulos a las 96 hdi (Fig. 10E). *C. truncatum* se comportó como patógeno intramural subcuticular en papaya y como hemibiótrofo intracelular en chícharo, por lo que la estrategia de infección depende del hospedante.

Además, Rojo-Báez *et al.* (2017) estudiaron el proceso de infección de *C. truncatum* en su interacción con fruto de papaya. La penetración directa por medio de apresorios ocurrió a las 30 hdi, las hifas intramurales crecieron en paredes celulares de la epidermis entre 30-48 hdi, la colonización necrotrófica inició a las 72 hdi causando una extensa degradación en células de parénquima y el rompimiento de cutícula por medio de acérvulos ocurrió entre 96-148 hdi. Las observaciones microscópicas en frutos de papaya revelaron que *C. truncatum* utiliza la estrategia de infección intramural subcuticular.

CONTROL

El control de enfermedades producidas por *Colletotrichum/Glomerella* depende principalmente de prácticas culturales tales como el uso de semillas

libres de enfermedad, rotación de cultivos, variedades vegetales resistentes, remoción de ramas muertas y frutos infectados; tratamiento físico (ejemplo: tratamiento hidrotérmico, ozono y atmósferas modificadas en frutos); control químico (fungicidas) y biológico (extractos de plantas, microorganismos antagonistas) (Phoulivong, 2011; Landero-Valenzuela *et al.*, 2016).

Dentro del control químico, los fungicidas de la clase benzimidazol y estrobilurinas (actúan inhibiendo la división nuclear y la respiración mitocondrial, respectivamente) se usan ampliamente en campo, estos fungicidas se encuentran vigentes en el registro sanitario de plaguicidas de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Torres-Calzada *et al.*, 2015; COFEPRIS, 2017); además, fungicidas como azoxystrobin, clorotalonil, mancozeb y tiabendazol se usan para el control de antracnosis en papaya y cuentan con registro por parte de la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) de los Estados Unidos de América (Santamaría-Basulto *et al.*, 2011).

En México, existen plaguicidas prohibidos y restringidos por su alto riesgo en la salud humana; además existen fungicidas de la clase benzimidazoles, maneb y captafol, los cuales están prohibidos en otros países pero están autorizados en México. El uso de plaguicidas que se han retirado del mercado y se ha prohibido su uso en países desarrollados como EEUU y Japón, puede deberse a la falta de actualización en la regulación de plaguicidas en México, así como la falta de monitoreo continuo que proporcione resultados certeros para establecer políticas de uso y manejo de plaguicidas (Gutierrez-Alonso *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha reportado que el uso continuo de fungicidas sintéticos ha generado resistencia en cepas de *Colletotrichum*. Por ejemplo, Torres-Calzada *et al.* (2015) determinaron que en *C. truncatum* existieron aislados resistentes a los fungicidas azoxystrobin y tiabendazol, y susceptibles a los fungicidas mancozeb y cyprodinil-fludioxonil; confirmando que la resistencia a tiabendazol se debe a una mutación en el gen β -tubulina debido a la sustitución de ácido glutámico a alanina. La presencia de cepas resistentes, a algunos productos químicos, ha incrementado el interés por desarrollar otros métodos

de control que sean efectivos y seguros para el consumidor y el ambiente, tal es el caso del control biológico.

Existen ejemplos del control biológico de antracnosis en manzana, papaya, aguacate, mango, entre otros (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005; Landero-Valenzuela *et al.*, 2016). *Bacillus subtilis* es ampliamente utilizada en el control de antracnosis debido a su potencial antagonista por competencia y antibiosis. Carrillo-Fasio *et al.* (2005) evaluaron la efectividad de *B. subtilis*, *Rhodotorula minuta* y su combinación en aplicaciones precosecha para el control de antracnosis (ocasionada por *C. gloeosporioides*) en mango a nivel postcosecha. La combinación de *R. minuta* más *B. subtilis* ($10^6 + 10^4$ ufc mL⁻¹), superó al control químico (benomil), lo que resultó prometedor para su uso comercial. Además, Patiño-Vera *et al.* (2005) desarrollaron un proceso de fermentación a nivel planta-piloto para la producción de la levadura *R. minuta*, lo que permitió desarrollar una formulación de bajo costo para la reducción de antracnosis en mango.

Por otra parte, los inductores de resistencia también forman parte del control de *Colletotrichum* spp. La inducción de resistencia a patógenos incluye el uso de elicitores físicos, químicos y biológicos; como por ejemplo el ácido salicílico y el ácido jasmónico, entre otros (Landero-Valenzuela *et al.*, 2016). Además, se han realizado estudios enfocados a la caracterización de cultivares resistentes a especies de *Colletotrichum*. Rodríguez-Guerra *et al.* (2006) postularon genes de resistencia en cultivares mejorados de frijol de valor comercial en México como Negro INIFAP (el cual posee los genes de resistencia Co-1) y Negro 8025 (genes Co-6 o Co-8), los cuales son resistentes a la mayoría de los patotipos de *C. lindemuthianum*.

CONCLUSIONES

Las especies de *Colletotrichum* son patógenos importantes debido a su amplio rango de hospedantes. En México, la identificación de especies es principalmente a nivel morfológico; sin embargo, en estudios recientes se ha realizado una identificación integral, la cual se basa en caracterización

morfológica y análisis molecular. Debido al complejo de especies que existen en *Colletotrichum*, además del análisis de regiones ITS, es necesario incluir regiones conservadas adicionales. Las principales especies reportadas en México a nivel morfológico y molecular son *C. gloeosporioides* y *C. truncatum*; se han realizado estudios sobre patógenesis y control en estas especies; sin embargo, es necesario ampliar los estudios al resto de *Colletotrichum* spp. para establecer futuras estrategias de control.

Agradecimientos Al proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financiado por SAGARPA, al CONACyT por el financiamiento a los estudios de I. Rojo-Báez.

LITERATURA CITADA

- Álvarez MG. 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. Fitofilo 71:169 p.
- Ávila-Quezada G, Silva-Rojas HV and Teliz-Ortiz D. 2007. First report of the anamorph of *Glomerella acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. Plant Disease 91:1200. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1200A>
- Barnett H y Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS Press. Minesota, USA. 197p.
- Benítez-Camilo FA., Huerta-Palacios G, Holguín-Meléndez F y Toledo-Arreola J. 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. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221218>
- Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller JM, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC and Johnston PR. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39:183-204. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-8.pdf>

- Cannon PF, Damm U, Johnston PR and Weir BS. 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181-213. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0014>
- Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Muy-Rangel MD, Sañudo-Barajas A, Márquez-Zequera I, Allende-Molar R, de la Garza-Ruiz Z, Patiño-Vera M y Galindo-Fentanes E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad postcosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:24-32. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223104>
- Casarrubias-Carrillo U, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D y Gutierrez-Alonso JG. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:88-93. Disponible en línea: <http://www.socmexfito.org/2014-01-08-17-34-56/2013-06-19-02-09-15/001-vol-20/101-revista-smf/2002/001/234-histopatologia-de-frutos-de-papaya-carica-papaya-l-infectados-por-colletotrichum-gloeosporioides-penz>
- Casarrubias-Carrillo U, González-Chavira MM, Cruz-Hernández A, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D y Guevara-González RG. 2003. Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. aislado de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:338-345. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221315>
- COFEPRIS, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 2017. Registro sanitario de plaguicidas y nutrientes vegetales. <http://www.cofepris.gob.mx> (Consulta, Febrero 2017).
- Cristóbal-Martínez AL, Yáñez-Morales MJ, Solano-Vidal R, Segura-León O and Hernández-Anguiano AM. 2017. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 147:605-614. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-016-1029-0>

- Crouch JA, Clarke BB, White JJF and Hillman BI. 2009a. Systematic analysis of the falcate spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. *Mycologia* 101:717-732. <http://dx.doi.org/10.3852/08-230>
- Crouch JA, Clarke BB and Hillman BI. 2009b. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101:648-656. <http://dx.doi.org/10.3852/08-231>
- Crouch JA, O'Connell R, Gan P, Buiate E, Torres MF, Beirn L, Shirasu K and Vaillancourt L. 2014. The genomics of *Colletotrichum*. Pp. 69-102. In: Dean RA, Lichens-Park A y Kole C (eds.) *Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens*. Vol 1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Alemania. 201p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-44053-7>
- Damm U, Woudenberg JHC, Cannon PF and Crous PW. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous host. *Fungal Diversity* 39:45-87. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/jinds3.php#vol39>
- Damm U, Baroncelli R, Cai L, Kubo Y, O'Connell R, Weir B, Yoshino K and Cannon PF. 2010. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. *International Mycological Association Fungus* 1:161-165. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3348780/>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC and Crous PW. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73:37-113. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0010>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP, Shivas RG and Crous PW. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73:1-36. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0002>
- Damm U, Cannon PF, Liu F, Barreto RW, Guantimosim E and Crous PW. 2013. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Diversity* 61:29-59. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-013-0255-4>

- Damm U, O' Connell RJ, Groenewald JZ and Crous PW. 2014. The *Colletotrichum destructivum* species complex – hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. *Studies in Mycology* 79:49-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.003>
- Dean R, Van JAL, Preorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di PA, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J and Foster GD. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:414-430. <http://dx.doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00783.x>
- Farr DF, Aime MC, Rossman AY and Palm ME. 2006. Species of *Colletotrichum* on *Agavaceae*. *Mycological Research* 110:1395-1480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2006.09.001>
- Fernández-Pavía SP, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Gregorio-Cipriano MR y Fernández-Pavía L. 2012. Enfermedades en plantas en el estado de Michoacán. *Biológicas* 14:75-89. Disponible en línea: <http://www.biologicas.umich.mx/index.php/biologicas/article/view/140>
- Fernández-Pavía SP, Gregorio-Cipriano R, Rodríguez-Alvarado G, Fernández-Pavía L, Mondragón FA, Gómez-Dorantes N, Lozoya-Saldaña H, Rodríguez-Fernández R y Herrera CJ. 2015. Enfermedades de especies vegetales en México. Primera edición. Morevalladolid. Morelia, Michoacán, México. 425p.
- Fraire-Cordero ML, Yáñez Morales MJ, Nieto-Ángel D, y Vázquez-Gálvez G. 2003. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:285-291. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221307>
- Fucikovsky L and Luna I. 1987. Avocado fruit diseases and their control in Mexico. *South African Avocado Growers' Association Yearbook* 10:119-121. Disponible en línea: <http://www.avocadosource.com>
- Groenewold-Labrada B, Mayek-Pérez N y Padilla-Ramírez JS. 2003. Hongos asociados a la semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:375-378. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221320>

- Gutiérrez-Alonso O, Nieto-Ángel D, Gutiérrez-Alonso JG, Delgadillo-Sánchez F. y Domínguez-Álvarez JL. 2002. Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 20:24-30. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220105>
- Gutiérrez-Alonso JG, Gutiérrez-Alonso O, Nieto-Ángel D, Téliz-Ortiz D, Zavaleta-Mejía E y Delgadillo-Sánchez F. 2004. Manejo integrado de la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] del mango (*Mangifera indica* L.) durante la postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 22:395-402. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222313>
- Hernández-Lauzardo AN, Campos-Martínez A, Velázquez-del Valle MG y Flores-Moctezuma HE. 2015. First report of *Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on avocado in Mexico. Plant Disease 99:555. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1019-PDN>
- Hyde KD, Cai L, Cannon PF, Crouch JA, Crous PW, Damm U *et al.* 2009a. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity 39:147-182. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-7.pdf>
- Hyde KD, Cai L, McKenzie EHC, Yang YL, Zhang JZ and Prihastuti H. 2009b. *Colletotrichum*: a catalogue of confusión. Fungal Diversity 39:1-17. Disponible en línea: <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD39-1-E.pdf>
- Hyde KD, Nilsson RH, Alias SA, Ariyawansa HA, Blair JE, *et al.* 2014. One stop shop: backbones tres for important phytopathogenic genera: I (2014). Fungal Diversity 67:21-125. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>
- Lagunes-Castro MS, López-Monteon A, Ramos-Ligonio A, Trigos A, Salinas A y Espinoza C. 2015. Actividad antibacteriana de extractos metanol: cloroformo de hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 87-94. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61240687008>

- Landero-Valenzuela N, Lara-Viveros FM, Andrade-Hoyos P, Aguilar-Pérez LA y Aguado RGJ. 2016. Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7:1189-1198. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263146723018>
- Leyva-Mir SG, Soto-Herrera A, Espitia-Rangel E, Villaseñor-Mir HE, González-Iñiguez RM y Huerta-Espino J. 2004. Etiología e incidencia de la antracnosis [*Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils.] de la avena (*Avena sativa* L.) en Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22:351-355. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222306>
- Lira-Saldivar RH, Hernández-Suárez M and Hernández-Castillo FD. 2006. Activity of *Larrea tridentata* (D.C.) Coville L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. Revista Chapingo Serie Horticultura 12:211-216. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60912212>
- Macedo CA, Martínez HA y Lara RJ. 2012. Rizobacterias aisladas del trópico húmedo con actividad antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, evaluación cuantitativa e identificación molecular. Revista Mexicana de Fitopatología 30:11-30. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225129002>
- Marin DH, Sutton TB, Blankenship SM and Swallow WH. 1996. Pathogenicity of fungi associated with Crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. Plant Disease 80:525-528. Disponible en línea: http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Abstracts/PD_80_525.htm
- Martínez-Bolaños M, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Valdovinos-Ponce G, Nieto-Ángel D, García-Pérez E y Sánchez-López V. 2015. Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Litchi Fruit (*Litchi chinensis* Soon.) in Oaxaca, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 33:140-

155. Disponible en línea:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145002>
- Montes-Belmont R, Nava-Juárez RA, Flores-Moctezuma HE y Mundo-Ocampo M. 2003. Hongos y nematodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el estado de Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología 21:300-304. Disponible en línea:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221309>
- Nava-Díaz C, Osada-Kawasoe S, Rendón-Sánchez G y Ayala-Escobar V. 2000. Organismos asociados a Hirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) en Michoacán, México. Agrociencia 34:217-226. Disponible en línea:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30234211>
- Orozco-Santos M, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Farías-Larios J y Timmer LW. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología 22:423-428. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222316>
- Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales J, Sandoval- Islas JS, Ayala-Escobar V, Soto-Rojas L y Alejo-Jaimes A. 2015. Distribución y Frecuencia de Organismos Asociados a la Enfermedad “Pata Prieta” de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), en Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 173-194. Disponible en línea:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145004>
- Patiño-Vera M, Jiménez B, Balderas K, Ortiz M, Allende R, Carrillo A and Galindo E. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. Journal of Applied Microbiology 99:540-550.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02646.x>
- Pérez MA, Navarro H y Miranda E. 2013. Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México. Revista Internacional de Contaminación

- Ambiental 29:45-64. Disponible en línea:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37028958003>
- Perfect ES, Hughes BH, O'Connell JR and Green RJ. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genetics and Biology 27:186-198.
<http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Phoulivong S. 2011. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. Current Research in Environmental & Applied Mycology 1:53-75. Disponible en línea:
<http://www.creamjournal.org/volume-1/issue-1.html>
- Quijano-Ramayo A, Herrera-Herrera JL, Canul-Salazar M. y Robert ML. 2002. Microbial diseases affecting henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) in Yucatan, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 20:18-23. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61220104>
- Réblová M, Gams W and Seifert KA. 2011. *Monilochaetes* and allied genera of the *Glomerellales*, and a reconsideration of families in the *Microascales*. Studies in Mycology 68:163-191. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2011.68.07>
- Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Rueda MT, Martínez VO and Simpson J. 2003. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. Plant Pathology 52:228-235. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00808.x>
- Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Rueda MT, Cabral-Enciso M, García-serrano M, Lira-Maldonado Z and Guevara-González G. 2005. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. Mycologia 97:793-803. <http://dx.doi.org/10.3852/mycologia.97.4.793>
- Rodríguez-Guerra R, Acosta-Gallegos JA, González-Chavira MM y Simpson J. 2006. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. Agricultura Técnica en México 32:101-114. Disponible en línea:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172006000100010

- Rodríguez-López ES, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Delgado S, Gutiérrez-Diez A y Mayek-Pérez N. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura* 35:898-905. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452013000300029>
- Rodríguez-Tovar A, Xoconostle-Cásarez B y Valdés M. 2004. Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 27:267-278. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61027307>
- Rojo-Báez I, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2016. Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 316-325. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-3>
- Rojo-Báez I, García-Estrada RS, Sañudo-Barajas A, León-Félix J y Allende-Molar R. 2017. Proceso de infección de antracnosis por *Colletotrichum truncatum* en papaya Maradol. *Revista Brasileira de Fruticultura* 39: 1-5. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017379>
- Sánchez-García BM, Flores-olivas A, Sánchez-Arizpe A, Pineda-Rodríguez S, López-Jiménez G, Fraire-Velásquez S, Garrido-Ramírez ER, Acosta-Gallegos JA, Simpson WJ y Rodríguez-Guerra R. 2009. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* en Oaxaca y San Luis Potosí, México y resistencia en genotipos de frijol. *Agricultura Técnica en México* 35:49-60. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60835105>
- Santamaría-Basulto F, Díaz-Plaza R, Gutiérrez-Alonso O, Santamaría-Fernández J y Larqué-Saavedra A. 2011. Control de dos especies de *Colletotrichum* y su efecto sobre el color y sólidos solubles totales en frutos de papaya Maradol. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 12:19-27. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81318808004>
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal

- transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. Proceedings of the National Academy of Sciences 109:6241-6246. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Silva-Rojas HV and Ávila-Quezada GD. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. Plant Pathology 60:899-908. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x>
- Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Lappe P, Larque-Saavedra A and Perez-Brito D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan península. Molecular Biotechnology 40:293-298. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-008-9093-0>
- Tapia-Tussell R, Cortes-Velázquez A, Valencia-Yah, Navarro C, Espinosa E, Moreno B and Perez-Brito D. 2016. First report of *Colletotrichum magnum* causing anthracnose in papaya in Mexico. Plant Disease 100:2323. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0324-PDN>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Garcez-Nexticapan A, Matin-Mex R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Higuera-Ciapara I and Perez-Brito D. 2011a. First report of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in *Jatropha curcas* in Yucatan, Mexico. New Disease Reports 23:6. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.023.006>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Matin-Mex R, Rojas-Herrera R, Higuera-Ciapara I and Pérez-Brito D. 2011b. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Colletotrichum capsici*. Molecular Biotechnology 49:48-55. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-011-9377-7>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I and Perez-Brito D. 2013. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L).

- European Plant Pathology 135:67-79. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I, Martin-Mex R, Nexticapán-Garcez A, and Pérez-Brito D. 2015. Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistant isolates. Plant Disease 99:1590-1595. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1183-RE>
- Udayanga D, Manamgoda DS, Liu X, Chukeatirote E and Hyde KD. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? Fungal Diversity 61:165-179. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-013-0257-2>
- Velázquez-del Valle MG, Campos-Martínez A and Flores-Moctezuma HE. 2016. First report of avocado anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. Plant Disease 100:534. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0249-PDN>
- Villanueva-Arce R, Hernández-Anguiano AM, Yáñez-Morales MJ, Téliz-Ortíz D, Mora-Aguilera A, Cárdenas-Soriano E y Castañeda-Vildózola A. 2005. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. Agrociencia 39:93-106. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30239109>
- Villanueva-Arce R, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Anguiano AM, Mora-Aguilera A y Téliz-Ortíz D. 2006. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. Agrociencia 40:773-782. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30240609>
- Villanueva-Arce R, Yáñez-Morales MJ, Téliz-Ortíz D y Hernández-Anguiano AM, 2008. Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill). Agrociencia 42:689-701. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30211218009>
- Weir BS, Johnston PR and Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73:115-180. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0011>

- Zhang N, Castlebury LA, Miller AN, Huhndorf SM, Schoch CL, Seifert KA, Rossman AY, Rogers JD, Volkmann-Kohlmeyer JKB and Sung GH. 2006. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* 98:1076-1087. <http://dx.doi.org/10.3852/mycologia.98.6.1076>
- Zhang N, Rossman AY, Seifert K, Bennett JW, Cai G, Cai L, Hillman B, Hyde KD, Luo J, Manamgoda D, Meyer W, Molnar T, Schoch C, Tadych M and White JF Jr. 2013. Impacts of the International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) on the scientific names of plant pathogenic fungi. *APS Feature*. <http://dx.doi.org/10.1094/APSFeature-2013-06>.
- Zavala-león MJ, Tun-Suárez JM, Cristóbal-Alejo J, Ruiz-Sánchez E, Gutiérrez-Alonso O, Vázquez-Calderón M y Méndez-González R. 2005. Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11:251-255. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60911210>

Cuadro 2. Especies de *Colletotrichum* reportadas en México con base en caracterización morfológica.

Especie	Hospedante	Referencia
<i>C. acutatum</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Orozco-Santos <i>et al.</i> , 2004
<i>C. agaves</i>	<i>Agave atrovirens</i> , <i>Agave sisalana</i> , <i>Agave tequilana</i>	Álvarez, 1976
<i>C. cerei</i>	<i>Cereus</i> spp.	Álvarez, 1976
<i>C. circinans</i>	<i>Allium cepa</i>	Montes-Belmont <i>et al.</i> , 2003
<i>C. coccodes</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Solanum tuberosum</i>	Álvarez, 1976; Lira-Saldívar <i>et al.</i> , 2006
<i>C. coffeanum</i>	<i>Cocothrinax readii</i>	Álvarez, 1976
<i>C. gigasporum</i>	<i>Coffea arabica</i>	Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Anacardium occidentale</i> , <i>Annona muricata</i> , <i>Annona</i> spp., <i>Annona cherimola</i> , <i>Bactris gasipae</i> , <i>Bixa Orellana</i> , <i>Byrsonima crassifolia</i> , <i>Carica papaya</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Chamaedorea elegans</i> , <i>Chamaedorea tepejilote</i> , <i>Citrullus vulgaris</i> , <i>Citrus aurantifolia</i> , <i>Citrus limetta</i> , <i>Citrus limón</i> , <i>Citrus maxima</i> , <i>Citrus nobilis</i> , <i>Citrus reticulata</i> , <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus</i> spp., <i>Coffea arabica</i> , <i>Cordia alliodora</i> ,	Fernández-Pavía <i>et al.</i> , 2012; Álvarez, 1976; Nava-Díaz <i>et al.</i> , 2000; Fernández-Pavía <i>et al.</i> , 2015; Casarrubias-Carrillo <i>et al.</i> , 2003; Zavala-León <i>et al.</i> , 2005; Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2013; Lagunes-Castro <i>et al.</i> , 2015; Martínez-Bolaños <i>et</i>

	<i>Dalbergia retusa</i> , <i>Eucalyptus citriodora</i> , <i>Euphorbia pulcherrima</i> , <i>Ficus carica</i> , <i>Ficus</i> spp., <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Litchi chinensis</i> , <i>Malus</i> spp., <i>Mangifera indica</i> , <i>Persea americana</i> , <i>Phoenix</i> <i>dactylifera</i> , <i>Phoradendron falcifer</i> , <i>Pouteria campechiana</i> , <i>Psidium</i> <i>guajava</i> , <i>Psidium</i> spp., <i>Pyrus communis</i>	<i>al.</i> , 2015; Benítez-Camilo <i>et al.</i> , 2003; Macedo <i>et al.</i> , 2012; Álvarez, 1976; Fucikovskiy y Luna, 1987; Gutiérrez- Alonso <i>et al.</i> , 2002; Cristóbal-Martínez <i>et</i> <i>al.</i> , 2017
C. graminicola	<i>Avena sativa</i> , <i>Sorghum halepense</i> , <i>Sorghum</i> spp., <i>Triticum</i> <i>aestivum</i>	Leyva-Mir <i>et al.</i> , 2004; Fernández-Pavía <i>et al.</i> , 2015
C. gossypii	<i>Gossypium hirsutum</i>	Álvarez, 1976
C. karstii	<i>Coffea Arabica</i>	Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017 Álvarez, 1976; Groenewold-Labrada <i>et</i> <i>al.</i> , 2003; Rodríguez-Guerra <i>et al.</i> , 2003; Sánchez-García <i>et al.</i> , 2009
C. lindemuthianum	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
C. luxificum	<i>Theobroma cacao</i>	Álvarez, 1976
C. lycopersici	<i>Solanum lycopersicum</i>	Álvarez, 1976
C. musae	<i>Musa sapientum</i> , <i>Musa paradisiaca</i>	Fernández-Pavía <i>et al.</i> , 2015; Lagunes-Castro <i>et al.</i> , 2015

C. nigrum	<i>Capsicum annuum</i>	Álvarez, 1976
C. orbiculare	<i>Citrullus vulgaris, Cucumis melo, Cucumis sativus, Cucurbita pepo</i>	Álvarez, 1976
C. siamense	<i>Coffea arabica</i>	Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
C. theobromicola	<i>Coffea arabica</i>	Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
C. trichellum	<i>Agave</i> spp.	Álvarez, 1976
C. trifolii	<i>Medicago sativa, Trifolium pratense</i>	Álvarez, 1976
C. truncatum	<i>Capsicum annuum, Carica papaya</i>	Álvarez, 1976; Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2013
C. viciae	<i>Vicia fabae</i>	Álvarez, 1976
G. cingulata	<i>Agave atrovirens, Capsicum</i> spp. <i>Carica papaya, Cydonia oblonga, Malus</i> spp., <i>Mangifera indica, Persea schiedeana, Pimienta dioica, Prunus persica, Prunus</i> spp., <i>Psidium guajava, Pyrus communis, Pyrus malus, Solanum lycopersicum, Vanilla planifolia</i>	Álvarez, 1976
G. gossypii	<i>Gossypium hirsutum</i>	Álvarez, 1976

G.	<i>Pyrus malus, Solanum lycopersicum</i>	Álvarez, 1976
<i>rufomaculans</i>		
Glomerella sp.	<i>Agave wislizani, Capsicum annuum, Persea americana</i>	Álvarez, 1976
G.	<i>Saccharum officinarum</i>	Álvarez, 1976
<i>tucumanensis</i>		

Cuadro 3. Especies de *Colletotrichum* reportadas en México con base en caracterización molecular.

Especie	Hospedero	Núm. acceso NCBI	Referencia
<i>C. acutatum</i>	<i>Leucaena</i> spp.	DQ286130	Farr <i>et al.</i> , 2006
<i>C. agaves</i>	<i>Agave</i> spp.	DQ286221	Farr <i>et al.</i> , 2006
<i>C. boninense</i>	<i>Persea Americana</i>	EU294266	Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011
<i>C. dematium</i>	<i>Liriope</i> sp.	DQ286154	Farr <i>et al.</i> , 2006
<i>C. fragarie</i>	<i>Annona cherimola</i>	AY605089	Villanueva-Arce <i>et al.</i> , 2005
<i>C. gigasporum</i>	<i>Coffea Arabica</i>	KT122924	Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
<i>C. godetiae</i>	<i>Persea Americana</i>	KM873226	Hernández-Lauzardo <i>et al.</i> , 2015
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Annona cherimola</i>	AY841132	Villanueva-Arce <i>et al.</i> , 2008
	<i>Coffea arabica</i>	KT122923	Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Carica papaya</i>	HM562710	Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2011b
	<i>Mangifera indica</i>	HM562712	
	<i>Persea americana</i>	HM562713	
<i>C. karstii</i>	<i>Persea americana</i>	KP729610	Velázquez-del Valle <i>et al.</i> ,
	<i>Coffea arabica</i>	KT122910	2016 Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
<i>C. liriopes</i>	<i>Liriope muscari</i>	GU227804	Damm <i>et al.</i> , 2009

<i>C. magnum</i>	<i>Carica papaya</i>	KT949404	Tapia-Tussell <i>et al.</i> , 2016
<i>C. orbiculare</i>	<i>Annona cherimola</i>	AY841133	Villanueva-Arce <i>et al.</i> , 2008
<i>C. siamense</i>	<i>Coffea Arabica</i>	KT122936	Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
<i>C. theobromicola</i>	<i>Coffea Arabica</i>	KT122919	Cristóbal-Martínez <i>et al.</i> , 2017
	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	KM519187	Ortega-Acosta <i>et al.</i> , 2015
<i>C. truncatum</i>	<i>Jatropha curcas</i>	HM450126	Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2011a
	<i>Tithonia rotundifolia</i>	HM450127	Torres-Calzada <i>et al.</i> , 2011b
	<i>Capsicum annuum</i>	HM562706	
	<i>Citrus limonium</i>	HM562705	
	<i>Carica papaya</i>	HM562709	
<i>G. acutata</i>	<i>Persea Americana</i>	EF221832	Ávila-Quezada <i>et al.</i> , 2007
<i>G. cingulata</i>	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	KM519191	Ortega-Acosta <i>et al.</i> , 2015
<i>G. lindemuthiana</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AY724682	Rodríguez-Guerra <i>et al.</i> , 2005

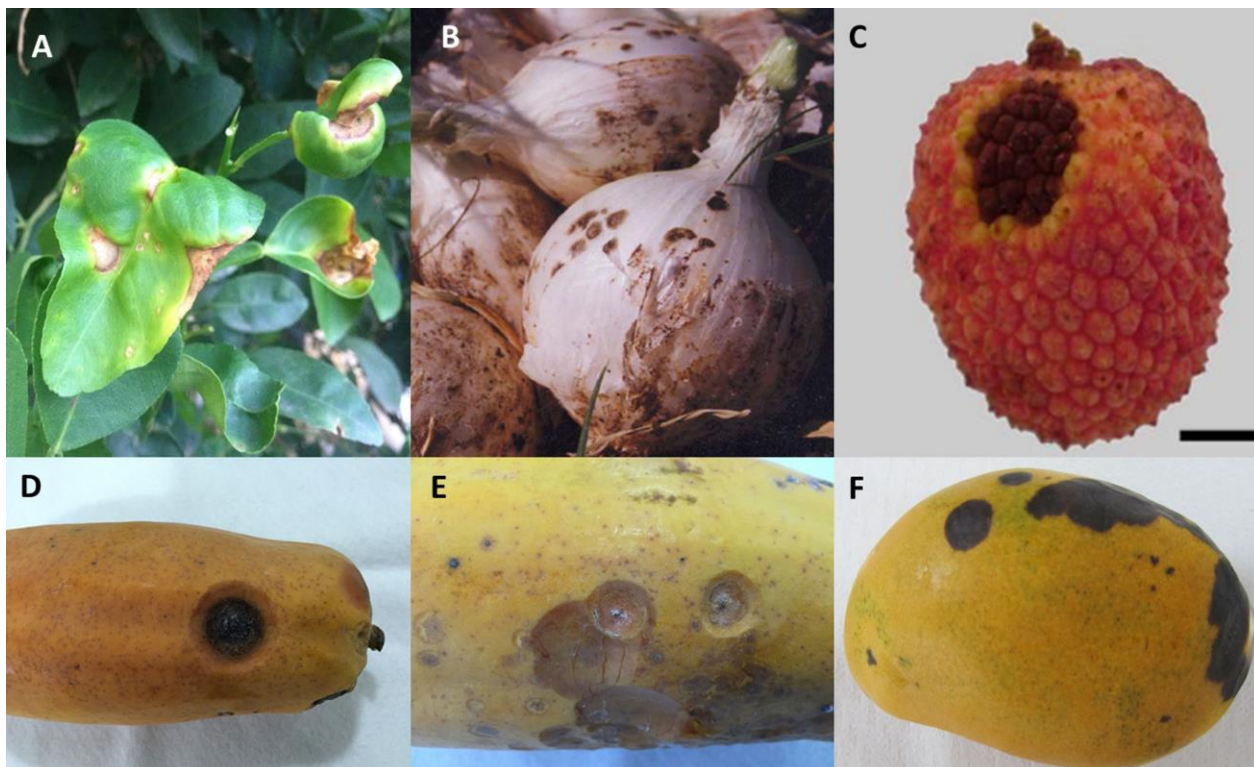


Figura 7. Síntomas de antracnosis ocasionados por *Colletotrichum* spp. A) *Colletotrichum* sp. en hojas de limón mexicano; B) *C. circinans* en cebolla (Tomado de Montes-Belmont *et al.*, 2003); C) *C. gloeosporioides* en litchi (Tomado de Martínez-Bolaños *et al.*, 2015); D) y E) *C. truncatum* y *C. gloeosporioides* en papaya; F) *C. gloeosporioides* en mango.

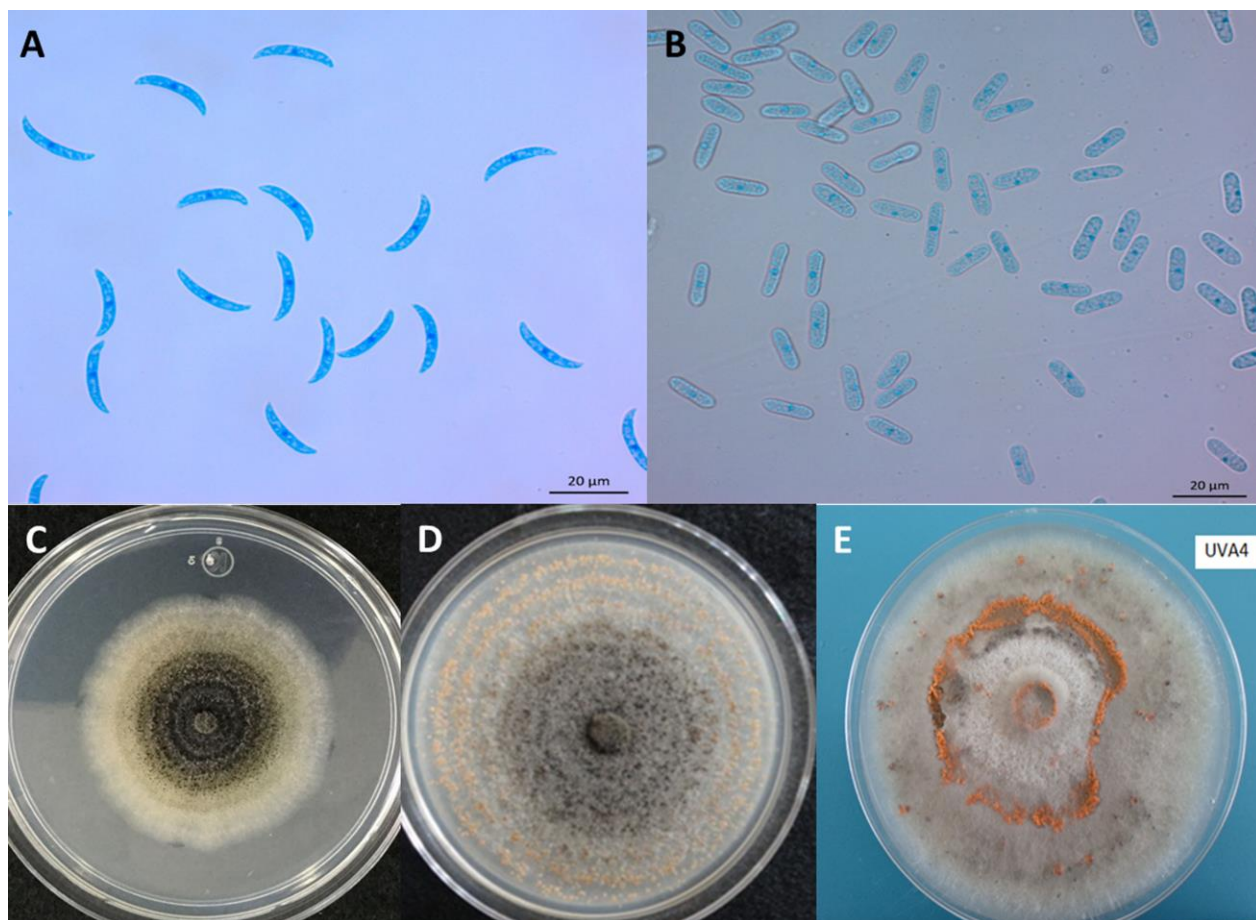


Figura 8. Características morfológicas de las principales especies de *Colletotrichum* en México. A) Conidios asexuales de *C. truncatum*; B) Conidios asexuales de *C. gloeosporioides*; C) Morfología colonial de *C. truncatum* en PDA; D) Morfología colonial de *C. gloeosporioides* en PDA; E) Morfología colonial de *Colletotrichum* sp. aislada de naranja.

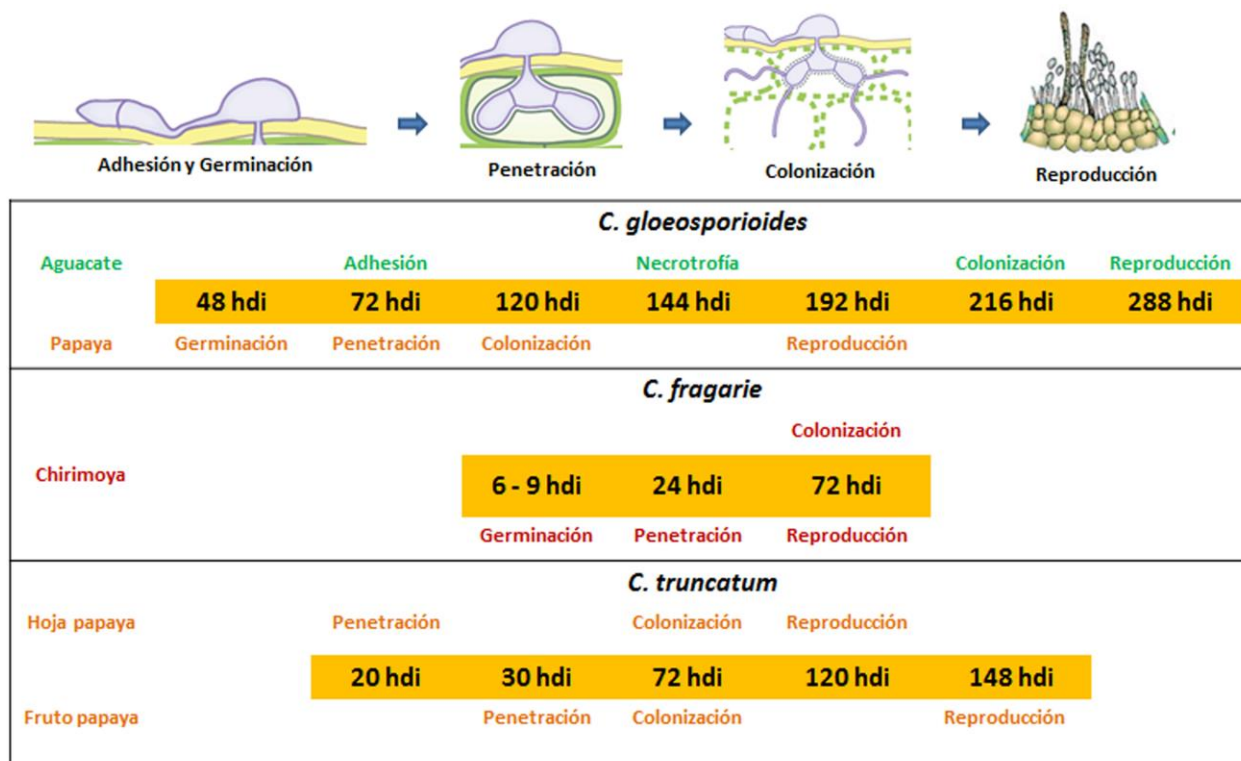


Figura 9. Etapas del proceso de infección de *Colletotrichum* spp. reportadas en México.

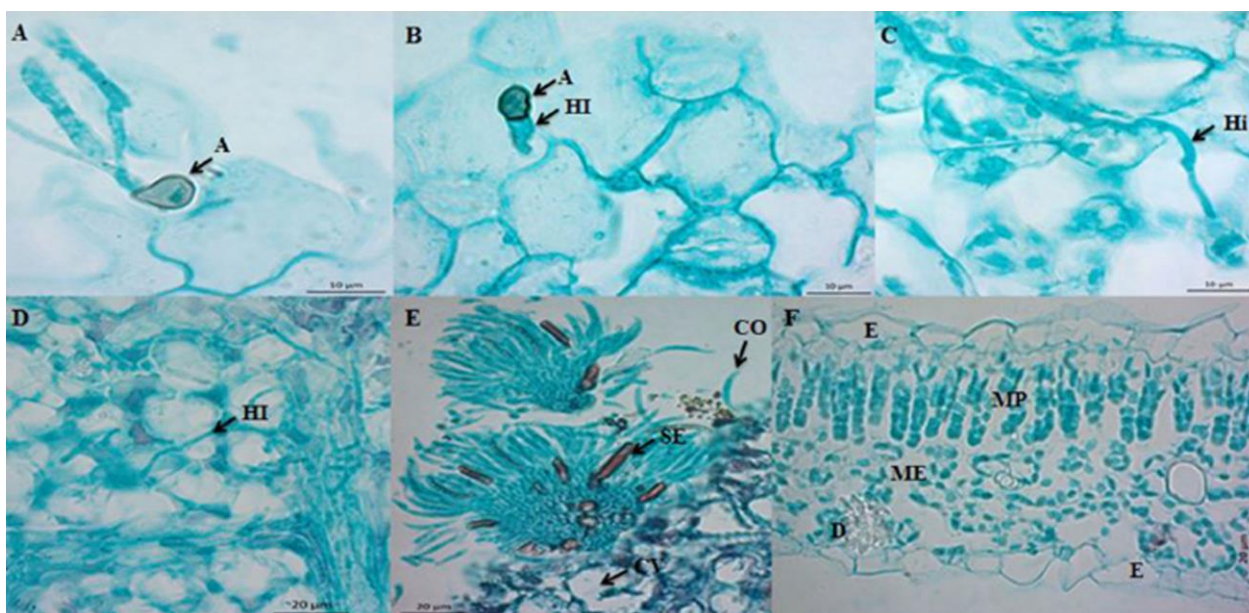


Figura 10. Colonización intramural subcuticular de *C. truncatum* en hojas escindidas de papaya cv. Maradol (Tomado de Rojo-Báez *et al.*, 2016). A) y B) Penetración, A=apresorio, HI= hifa de infección; C) y D) Colonización, HI= hifa intramural, HI= hifa

intracelular; E) Reproducción, acérvulos con CO=conidios y SE=setas y F) Tejido sano, E=epidermis, MP=mesófilo en empalizada, ME=mesófilo esponjoso y D=drusa.

CAPÍTULO IV: SEGUNDO ARTÍCULO

PROCESO DE INFECCIÓN DE ANTRACNOSIS POR *Colletotrichum truncatum* EN PAPAYA MARADOL

ROJO-BÁEZ INDIRA², GARCÍA-ESTRADA RAYMUNDO SAÚL³, SAÑUDO-BARAJAS J. ADRIANA⁴, LEÓN-FÉLIX JOSEFINA⁵, ALLENDE-MOLAR RAÚL⁶

²M.C. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Culiacán a El Dorado, km 5.5. Campo el Diez, C. P. 80110, Culiacán, Sinaloa, México. Tel. (+52) 6677605536. E-mail: indira.rojo@estudiantes.ciad.mx.

³Dr. Investigador titular. Departamento de Fitopatología. CIAD Culiacán. E-mail: rsgarcia@ciad.mx

⁴Dra. Investigador titular. Departamento de Bioquímica y Fisiología Vegetal. CIAD Culiacán. E-mail: adriana@ciad.mx

⁵Dra. Investigador titular. Departamento de Biología Molecular. CIAD Culiacán. E-mail: ljosefina@ciad.mx

⁶Dr. Investigador titular. Departamento de Fitopatología. CIAD Culiacán. E-mail: rallende@ciad.mx

Artículo publicado en: Revista Brasileira de Fruticultura.

Rajo-Báez I, García-Estrada RS, Sañudo-Barajas JA, León-Félix J y Allende-Molar R. 2017. Proceso de infección de antracnosis por *Colletotrichum truncatum* en papaya Maradol. Revista Brasileira de Fruticultura 39:1-5. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452017379>

RESUMEN *Colletotrichum truncatum* es un hongo patógeno causante de antracnosis en fruto de papaya (*Carica papaya* L.) y responsable de pérdidas postcosecha. El objetivo de este trabajo fue inducir el proceso de infección de *C. truncatum* en frutos de papaya var. Maradol bajo condiciones controladas y describir el progreso de la enfermedad mediante herramientas histopatológicas y microscopía óptica para elucidar el ciclo de vida del patógeno. La penetración directa de la cutícula por medio de apresorios ocurrió alrededor de las 30 h después de inoculación (hdi); las hifas intramurales crecieron en las paredes celulares de células epidérmicas a las 30-48 hdi; la colonización necrotrófica inició a las 72 hdi; hifas intracelulares crecieron dentro de células de parénquima causando una extensiva degradación celular lo cual se asocia a la producción de lesiones típicas de antracnosis. El rompimiento de la cutícula del hospedero ocurrió entre las 96-148 hdi. El ciclo de vida del patógeno se completó a las 96 hdi con la formación de acérvulos. Las observaciones microscópicas en frutos de papaya revelaron que *C. truncatum* es un patógeno intramural subcuticular.

Palabras clave: *Carica papaya* L., patogénesis, patógeno intramural.

INFECTION PROCESS OF ANTHRACNOSE BY *COLLETOTRICHUM TRUNCATUM* ON PAPAYA MARADOL

ABSTRACT *Colletotrichum truncatum* is a pathogenic fungus causing anthracnose in papaya fruit (*Carica papaya* L.) and responsible for losses on postharvest. The purpose of this work was to induce the infection process of *C. truncatum* on fruit of papaya cv. Maradol under controlled conditions and to describe the disease progress by histopathological and light microscopy tools in order to elucidate the pathogen life cycle. Direct cuticle penetration by appresoria occurred around 30 h after inoculation (hai); the intramural hyphae grew on the epidermic cell wall layer at 30-48 hai; necrotrophic colonization

started at 72 hai; intracellular hyphae grew into parenchymal cells causing extensive cell wall degradation in association to water-soaked lesions production. The time for the host cuticle breakdown occurred between 96-148 hai. The pathogen life cycle was completed at 96 hai with acervuli formation. Microscopic observations on papaya fruits revealed that *C. truncatum* is a subcuticular intramural pathogen.

Index terms: *Carica papaya*, pathogenesis, intramural pathogen.

Antracnosis, una de las principales enfermedades que afectan a papaya (*Carica papaya* L.), se encuentra distribuida en áreas tropicales y subtropicales a nivel mundial afectando frutos en pre- y poscosecha. En México, las pérdidas reportadas superan el 50 %. Además, la antracnosis en papaya se asociaba solamente con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* cuya infección causa lesiones húmedas, hundidas y con masas de conidios de color naranja (TORRES-CALZADA et al., 2013); sin embargo, en 2008 se reportó adicionalmente a *C. truncatum* (Schwein) Andrus & W.D. Moore (antes *C. truncatum*) (MAHMUDI et al., 2014) (TAPIA-TUSSELL et al., 2008) cuya infección causa lesiones de color marrón a negro, con masas de esporas de color gris y abundantes acérvulos dispuestos concéntricamente (TAPIA-TUSSELL et al., 2008); además, presenta una incidencia de hasta 40 % (TORRES-CALZADA et al., 2013). Si bien se reportó a *C. truncatum* como agente causal de antracnosis en papaya, son escasos los estudios enfocados al proceso de patogénesis en este hospedero. Un aspecto importante del proceso de patogénesis es la estrategia de infección empleada por el patógeno (PERFECT et al., 1999). De acuerdo al hospedero, *C. truncatum* utiliza estrategias de infección diferentes, ya que se comporta como patógeno hemibiotrófico intracelular en chícharo, haba y lenteja (O'CONNELL et al., 1993; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2007; ARMSTRONG-CHO et al., 2012; BHADAURIA et al., 2013) o como patógeno intramural subcuticular en chile (AUYONG et al., 2012; RANATHUNGE et al., 2012). En papaya, se desconoce

la estrategia de infección que emplea *C. truncatum* para causar antracnosis en frutos. El objetivo de este estudio fue describir, mediante técnicas histológicas, la estrategia de infección que utiliza *C. truncatum* en fruto de papaya Maradol. La cepa CCM de *C. truncatum*, previamente caracterizada molecularmente (KF147902), proveniente de un fruto de papaya cv. Maradol con antracnosis se utilizó en los ensayos de patogenicidad. Veinte frutos sanos de papaya en madurez de consumo se lavaron con agua corriente, se secaron, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y con etanol al 70%, se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente; posteriormente, quince frutos se inocularon artificialmente, en tres puntos de la superficie (1 cm²) sin causar heridas con 10 µL de una suspensión de esporas (1x10⁶ esporas/mL), previamente colectadas de un cultivo monospórico de *C. truncatum* de siete días de crecimiento en PDA. A cinco frutos testigo (un fruto por día) solo se les colocó 10 µL de agua destilada estéril. Se tomaron secciones de tejido de las áreas inoculadas a las 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 48, 60, 72, 96, 120 y 148 h después de inoculación (hdi). Todos los frutos se colocaron en cámara húmeda a 25°C ± 2°C durante seis días (MORAES et al., 2013). A las 148 hdi, se midió el diámetro de la lesión en frutos usando un calibrador (Vernier, México). Se analizaron porciones de tejido de 5 mm de las áreas inoculadas; las cuales se colocaron en casetes de plástico, se etiquetaron y se sumergieron en solución fijadora FAA (Formaldehído-ácido acético-alcohol) donde permanecieron al menos durante 24 h. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol etílico (50, 70, 80, 96 y 100 %) y se infiltraron en parafina, mediante la transferencia en alcohol absoluto-xileno (v/v), en xileno (dos veces) y en parafina Leica (dos veces). Los tejidos permanecieron en las soluciones durante 3 h y finalmente, se agitaron dos veces en un procesador de tejidos centrífugo (Thermo Scientific, STP 120, GER) (CASARRUBIAS-CARRILLO et al., 2002). En un centro de inclusión (Thermo Scientific, HistoStar, UK), los tejidos se colocaron en moldes metálicos con parafina fundida, se orientaron vertical y horizontalmente, se les colocó un casete de plástico, se agregó parafina fundida y se dejaron enfriar;

posteriormente, los tejidos se colocaron en un micrótopo semiautomático (Thermo Scientific, Microm HM340E, GER) y se obtuvieron cortes longitudinales y transversales de 6 μm de grosor. Los cortes se colocaron en portaobjetos con adhesivo Haupt, colocándolos previamente en un baño de flotación (Fisher Scientific, model 134, USA) con agua caliente (50 °C), se les eliminó el exceso de agua y se secaron a temperatura ambiente durante 24 h. Brevemente, se eliminó la parafina de los tejidos mediante tres lavados de 3 min con xileno y después se deshidrataron con concentraciones decrecientes de etanol (100, 96, 70 y 50 %) durante 3 min cada uno. Se realizó la tinción con safranina al 1 % en alcohol etílico al 50 %, durante 2 h. Posteriormente, los cortes se deshidrataron en una serie gradual de etanol (50, 70 y 96 %) durante 3 min cada uno. Se realizó la tinción con verde-rápido al 1 % en etanol al 96 %, durante 30 s. Posteriormente, se realizó un lavado con alcohol absoluto y tres lavados con xileno durante 3 min, respectivamente; finalmente, a los portaobjetos se les agregó resina Entellan y se secaron durante 24 h (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al., 2013). Las laminillas se observaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss Axiostar Imager A2 con cámara integrada. Los apresorios se midieron con el software ZEN 2012 (blue edition). La germinación de los conidios de *C. truncatum* en fruto de papaya, inició a partir de las 20 hdi. Los tubos germinativos emergieron a partir de los conidios de manera polar y lateral. A las 30 hdi, a partir del tubo germinativo se formaron apresorios melanizados, de coloración café oscura, de forma globosa a irregular con medidas promedio de 7.42 x 4.89 μm (Figura 11B). Las especies de *Colletotrichum* forman apresorios melanizados para facilitar la adhesión y la penetración, por medio de acción mecánica y lisis enzimática (KLEEMANN et al., 2012). Debido a la formación de apresorios, la penetración fue de manera directa. En los apresorios se observó un punto carente de melanina lo que sugiere un poro donde ocurre segregación enzimática necesaria durante la penetración (RANATHUNGE et al., 2012). *C. truncatum* segrega cutinasa para romper la cutícula del hospedero. En Chile, la cutinasa es esencial para causar la ruptura de la cutícula (AUYONG et al., 2015). De acuerdo con Dickman et al. (1982), *C. gloeosporioides* produce

cutinasa extracelular, como estrategia de penetración de la cutícula en frutos de papaya en madurez fisiológica y comercial. Además, se observó una coloración rojiza en las células epidérmicas en contacto con los apresorios (Figura 1B). De acuerdo con Rodríguez-López et al. (2013) el desarrollo de *C. gloeosporioides* se relacionó con una coloración roja en células epidérmicas y células de parénquima del exocarpio de aguacate producto de la metabolización de polifenoles. La producción de polifenoles se relaciona con la restricción del crecimiento fúngico en el sitio de infección (VARGAS et al., 2012). Se observaron hifas intramurales en las paredes de las células epidérmicas del hospedero entre las 30 y 48 hdi. Por otro lado, en este estudio no fue posible observar hifas debajo de la cutícula como en el estudio de Diéguez-Uribeondo et al. (2005); no obstante, se observaron hifas intramurales en las paredes de las células epidérmicas del hospedero (Figura 11C), por lo que se puede inferir que la hifa de infección atravesó la capa subcuticular a lo largo de la pared celular de la epidermis (RANATHUNGE et al., 2012). De acuerdo con Pring et al. (1995), las hifas intramurales crecieron en las paredes celulares de las células epidérmicas. Por otra parte, las hifas intracelulares se observaron en células de parénquima a las 72 hdi, las hifas de infección atravesaron las paredes celulares del hospedero (Figura 11D). En esta etapa el patógeno obtiene nutrientes del contenido celular del hospedero por lo que la infección se asocia principalmente con la producción de enzimas líticas tales como proteasas y enzimas carbohidrato-activas que degradan los polisacáridos de las paredes celulares (O'CONNELL et al., 2012). A las 96 hdi se observó una extensa colonización de células epidérmicas y de parénquima sin daño en la cutícula ya que se observó crecimiento de hifas subcuticulares (Figura 11E), las cuales podrían estar involucradas en la formación de los acérvulos. De acuerdo con Moraes et al. (2013), durante el estado necrótrofo, *C. gloeosporioides* produce hifas intracelulares que colonizan células epidérmicas y de parénquima en su interacción con guayaba. La formación de acérvulos inició a partir de las 96 hdi y hasta las 148 hdi. Los acérvulos, emergieron de la superficie del hospedero al romper la cutícula (Figura 11F). La presencia de múltiples

acérvulos se asoció con zonas hundidas de coloración oscura en la superficie del fruto, cuyo diámetro fue de 4.2 cm, en contraste con el fruto testigo el cual no presentó síntomas de enfermedad (Figura 11A). El daño celular y la producción de acérvulos se asociaron a la aparición de los síntomas de enfermedad los cuales iniciaron a las 72 hdi, lo cual contrasta con lo reportado por Casarrubias-Carrillo (2002), quienes señalan que los síntomas de enfermedad en fruto de papaya en madurez comercial ocasionados por *C. gloeosporioides* iniciaron a las 90 hdi. El hecho de que *C. truncatum* ocasionó síntomas de antracnosis al tercer día de infección puede deberse a la formación de apresorios, lo que le permitió penetrar de manera directa la cutícula intacta del fruto de papaya y así iniciar la infección; a diferencia de *C. gloeosporioides* el cual no formó apresorios en su interacción con papaya lo que ocasionó la aparición tardía de los síntomas de enfermedad. En conclusión, en fruto de papaya, *C. truncatum* utilizó la estrategia de infección intramural subcuticular, causó síntomas de antracnosis a las 72 h, y produjo acérvulos desde las 96 h después de inoculación con lo que completó su ciclo de vida. *C. truncatum* se comporta como patógeno intramural subcuticular en su interacción con el fruto de papaya; estos resultados contribuyen a entender el proceso de infección en el ciclo de la enfermedad causada por *C. truncatum* en frutos de papaya y serán útiles para plantear nuevas estrategias para el control de la enfermedad. Se agradece al proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financiado por SAGARPA, al CONACyT por el financiamiento a los estudios de I. Rojo-Báez y a la Dra. Apolinar Santamaría Miranda del CIIDIR-IPN Sinaloa por su apoyo para realizar el análisis histopatológico en su laboratorio.

REFERENCIAS

ARMSTRONG-CHO, C.; WANG, J.; WEI, Y.; BANIZZA, S. The infection process of two pathogenic races of *Colletotrichum truncatum* on lentil. **Canadian Journal Plant Pathology**, Alberta, v.34, n.1, p.58-67, 2012.

AUYONG, A.S.M.; FORD, R.; TAYLOR, P.W.J. Genetic transformation of *Colletotrichum truncatum* associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v.52, n.4, p.372–382, 2012.

AUYONG, A.S.M.; FORD, R.; TAYLOR, P.W.J. The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. **Journal Plant Pathology & Microbiology**, Geneva, v.6, n.3, p.259, 2015. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000259>>. Acceso en: 5, jul. 2016.

BHADAURIA, V.; BANNIZA, S.; VANDENBERG, A.; SELVARAJ, G.; WEI, Y. Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. **Eukaryotic Cell**, Washington, v.12, n.1, p.2-11, 2013.

CASARRUBIAS-CARRILLO, U.; CÁRDENAS-SORIANO, E.; NIETO-ÁNGEL, D.; GUTIÉRREZ-ALONSO, G. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Ciudad Obregón, v.20, n.1, p.88-93, 2002.

DICKMAN, M.B.; PATIL, S.S.; KOLATTUKUDY, P.E. Purification, characterization and role in infection of an extracelular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. **Physiological Plant Pathology**, Michigan, v.20, n.3, p.333-347, 1982.

DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; FÖRSTER, H.; SOTO-ESTRADA, A.; ADASKAVEG, J.E. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. **Phytopathology**, St. Paul, v.95, n.7, p.751-758, 2005.

KLEEMANN, J.; RINCON-RIVERA, L.J.; TAKAHARA, H.; NEUMANN, U.; THEMAAT, E.V.L.V.; DOES, C.V.D.; ET AL. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. **Plos Pathogens**, California, v.8, n.4, p. 1-15, 2012.

LATUNDE-DADA, A.O.; LUCAS, J.A. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C.*

linicola and *C. truncatum*. **Plant Pathology**, Chichester, v.56, n.3, p.437–447, 2007.

MAHMODI, F.; KADIR, J.B.; PUTEH, A.; POURDAD, S.S.; NASEHI, A.; SOLEIMANI, N. Genetic diversity and differentiation of *Colletotrichum* spp. isolates associated with leguminosae using multigene loci, RAPD and ISSR. **Plant Pathology Journal**, Suwon, v.30, n.1, p.10-24, 2014.

MORAES, G.S.R.; TANAKA O.F.A.; MASSOLA J.N.S. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.35, n.2, p.657-664, 2013.

O'CONNELL, R.J.; URONU, A.B.; WAKSMAN, G.; NASH, C.; KEON, J.P.R.; BAILEY, J.A. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. **Plant Pathology**, London, v.42, n.5, p.774-783, 1993.

O'CONNELL, R.J.; THON, M.R.; HACQUARD, S.; AMYOTTE, S.G.; KLEEMANN, J.; TORRES, M.F; ET AL. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, New York, v.44, n.9, p.1060-1067, 2012.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.27, n.2, p.186-198, 1999.

PRING, R.J.; NASH, C.; ZAKARIA, M.; BAILEY, J.A. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.46, p.137-152, 1995.

RANATHUNGE, N.P.; MONGKOLPORN, O.; FORD, R.; TAYLOR, P.W.J. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defense mechanisms. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v.41, p.463-473, 2012.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, E.S.; CÁRDENAS-SORIANO, E.; HERNÁNDEZ-DELGADO, S.; GUTIÉRREZ-DIEZ, A.; MAYEK-PÉREZ, N. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de

aguacatero. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.35, n.3, p.898-905, 2013.

TAPIA-TUSSELL, R.; QUIJANO-RAMAYO, A.; CORTES-VELÁZQUEZ, A.; LAPPE, P.; LARQUE-SAAVEDRA, A.; PEREZ-BRITO D. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatán peninsula. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.40, n.3, p.293-298, 2008.

TORRES-CALZADA, C.; TAPIA-TUSSELL, R.; HIGUERA-CIAPARA, I.; PÉREZ-BRITO, D. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). **European Journal of Plant Pathology**, Sochi, v.135, n.1, p.67-79, 2013.

VARGAS, W.A.; SANZ, M.J.M.; RECH, G.E.; RIVERA, L.P.; BENITO, E.P.; DÍAZ-MÍNGUEZ, J.M.; ET AL. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.158, n.3, p.1342-1358, 2012.

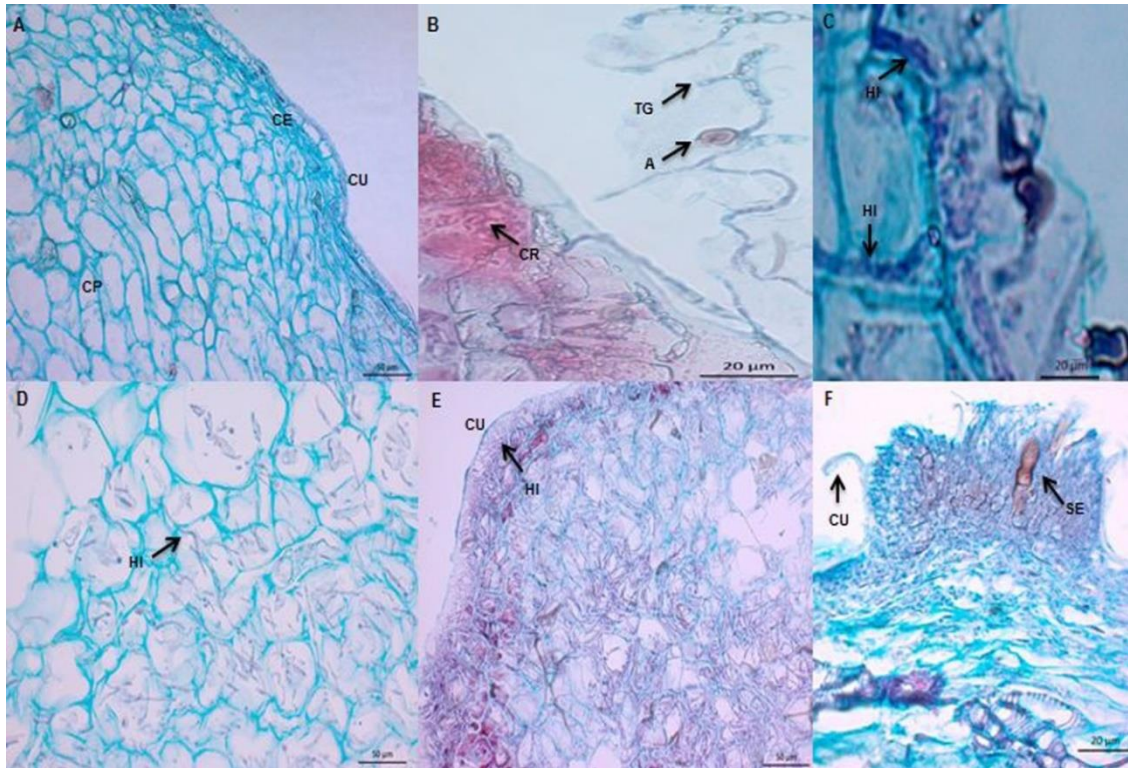


Figura 11. Fotomicrografías del proceso de infección de *C. truncatum* en frutos de papaya Maradol en madurez comercial. A) Corte longitudinal de fruto sano de papaya (CU= cutícula; CE= células epidérmicas; CP= células de parénquima; Barra = 50 μ m). B) Corte longitudinal de fruto infectado a las 30 h después de inoculación (hdi), se observa conidio con tubo germinativo y apresorio melanizado, coloración rojiza en células epidérmicas (A=apresorios melanizados; TG= tubos germinativos; CR= coloración rojiza; Barra = 20 μ m). C) Corte longitudinal de fruto infectado por *C. truncatum* a las 30 hdi, hifas intramurales en células epidérmicas (HI= hifas intramurales; Barra = 20 μ m). D) Corte longitudinal de fruto infectado a las 72 hdi, hifas intracelulares en células de parénquima (HI= hifas intracelulares; Barra = 50 μ m). E) Corte longitudinal de fruto infectado a las 96 hdi, hifas intracelulares debajo de la cutícula (CU= cutícula; Barra = 50 μ m). F) Corte transversal de fruto infectado a las 148 hdi, acérvulo con setas emergiendo de epidermis (CU= cutícula; SE= setas; Barra = 20 μ m).

CAPÍTULO V: TERCER ARTÍCULO

HISTOPATOLOGÍA DEL PROCESO DE INFECCIÓN DE *Colletotrichum truncatum* EN HOJAS DE PAPAYA Y CHÍCHARO

HISTOPATHOLOGY OF THE INFECTION PROCESS OF *Colletotrichum truncatum* IN PAPAYA AND PEA LEAVES

Indira Rojo-Báez, Raymundo S. García-Estrada, Josefina León-Félix, Adriana Sañudo-Barajas, Raúl Allende-Molar* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación Culiacán. Carr. Culiacán-Eldorado km 5.5, Campo el Diez, CP. 80110, Culiacán, Sinaloa, México. *Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Artículo publicado en: Revista Mexicana de Fitopatología.

Rojo-Báez I, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2016. Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo. Revista Mexicana de Fitopatología 34:316-325. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-3>

Resumen *Colletotrichum truncatum* es un hongo patógeno causante de antracnosis en diversos hospedantes; se desconoce el proceso de infección de este patógeno en hojas de papaya, así como el comportamiento de una misma cepa de *C. truncatum* en distintos hospedantes. El objetivo de este estudio fue describir, mediante técnicas histológicas, el proceso de infección de una cepa de *C. truncatum* en hojas de papaya y chícharo. En los dos hospedantes, la penetración del hongo ocurrió de manera directa por medio de apresorios alrededor de las 20 h después de la inoculación (hdi). En papaya, las hifas crecieron intercelularmente a las 24-60 hdi; la colonización necrotrofica inició a las 60 hdi; hifas intracelulares crecieron en células del mesófilo causando una extensiva degradación celular; en contraste, en chícharo se observaron hifas primarias de infección a partir de las 36 hdi, las hifas secundarias de infección (estado necrótrofo) se observaron a las 72 hdi. En ambos hospedantes, los acérvulos se observaron a las 96 hdi, lo cual se asoció con la producción de lesiones típicas de antracnosis. *Colletotrichum truncatum* se comportó como patógeno intramural subcuticular en papaya y como hemibiótrofo intracelular en chícharo; por lo que la estrategia de infección es dependiente del hospedante.

Palabras clave: *Carica papaya*, *Pisum sativum*, patógeno intramural, patógeno intracelular.

Abstract *Colletotrichum truncatum* is a pathogenic fungus causing anthracnose in several host; the infection process of this pathogen in papaya leaf as well as studies of the same strain of *C. truncatum* in different hosts is unknown. The aim of this study was to describe the infection process of a *Colletotrichum truncatum* strain by histological techniques in papaya and pea leaves. In both hosts, direct penetration occurred through appressoria around 20 h after inoculation (hai). In papaya, intercellular hyphae grew at 24-60 hai; the necrotrophic colonization began at 60 hai; intracellular hyphae grew in mesophyll cells causing extensive cellular degradation; in contrast, in pea primary infection hyphae began at 36 hai, secondary infection hyphae (necrotrophic state) began at 72 hai. In both

hosts, the acervuli were observed at 96 hai, which was associated with typical anthracnose lesions. *C. truncatum* behaved as intramural subcuticular pathogen in papaya and as intracellular pathogen in pea; so that, the infection strategy is dependent on the host.

Keywords: *Carica papaya*, *Pisum sativum*, intramural pathogen, intracellular pathogen.

Colletotrichum spp., agente causal de la antracnosis, afecta a un amplio rango de hospedantes en pre y poscosecha. Las especies de *Colletotrichum* emplean diferentes estrategias de infección: intramural subcuticular o intracelular; incluso, ambas en distintos órganos del mismo hospedero (Perfect *et al.*, 1999; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2005). Las estrategias de infección están correlacionadas con la especificidad en el hospedante (Pring *et al.*, 1995), por lo que es importante conocer el proceso de infección para determinar el ciclo biológico de la enfermedad, lo que podría sugerir el uso adecuado de una estrategia de control al conocer el periodo en el que se desarrolla el patógeno en el hospedante.

La antracnosis es una de las principales enfermedades en el cultivo de papaya. En México, las pérdidas reportadas superan el 50 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). *Colletotrichum truncatum* se reportó en 2008 como causante de antracnosis en papaya en México (*Carica papaya*) (Tapia-Tusell *et al.*, 2008), con una incidencia de hasta 40 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). Esta especie utiliza mecanismos de infección distintos, ya que se comporta como patógeno hemibiotrófico intracelular en chícharo (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*) y lenteja (*Lens culinaris*) (O'Connell *et al.*, 1993; Latunde-Dada y Lucas, 2007) y como patógeno intramural subcuticular en chile (*Capsicum annuum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Pring *et al.*, 1995; Ranathunge *et al.*, 2012). Aunque existen diversos estudios relacionados con esta especie, se desconoce el proceso de patogénesis en

hojas de papaya; además, existe escasa información en donde se describa el proceso de infección de una misma cepa del patógeno en distintos hospedantes. El objetivo de este estudio fue describir los cambios histológicos que se presentan durante la infección de hojas de papaya y chícharo por *C. truncatum*.

Se utilizaron hojas de plantas sanas de papaya Cv. Maradol (tres meses de edad) y chícharo Cv. Lincoln (tres semanas de edad). La cepa CCM de *C. truncatum* se utilizó como inóculo. Previamente se aisló de un fruto de papaya con síntomas de antracnosis, se purificó mediante cultivo monospórico y se caracterizó molecularmente (KF147902). La suspensión de conidios se preparó a una concentración de 1×10^6 esporas/mL a partir de un cultivo de siete días de crecimiento en PDA. La superficie abaxial de 15 hojas de papaya y 30 hojas de chícharo, previamente desinfectadas con etanol al 70 %, se inoculó en seis y tres puntos de 1 cm^2 respectivamente, por deposición de 10 μL de inóculo. Como tratamiento testigo, se colocaron alícuotas de 10 μL de agua destilada estéril en cinco hojas de papaya y 10 hojas de chícharo. Las hojas de papaya se colocaron en bolsas de polietileno con papel absorbente humedecido con agua destilada (Pandey *et al.*, 2012) y las de chícharo en cajas Petri de vidrio con papel filtro Whatman N° 2 esterilizado y humedecido con agua destilada para incrementar la humedad relativa. Todas las hojas se incubaron a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante seis días. Se tomaron secciones de 5 mm de tejido de las áreas inoculadas a las 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 148 horas después de la inoculación (hdi), y se colocaron en casetes de plástico para incluirlas en parafina. Las muestras se sumergieron en solución fijadora FAA (10 % formaldehído, 5 % ácido acético, 50 % etanol al 96%) durante al menos 24 h. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron gradualmente con alcohol etílico (50, 70, 80, 96 y 100 %) y se infiltraron en parafina Leica durante 3 h, previa transferencia en alcohol absoluto-xileno (v/v) y xileno (dos veces) (Rodríguez-López *et al.*, 2013). Las muestras permanecieron en las soluciones

durante 3 h y finalmente, se agitaron dos veces en un procesador de tejidos centrífugo (Thermo Scientific, STP 120, GER).

En un centro de inclusión (Thermo Scientific, HistoStar, UK), las muestras se colocaron en moldes metálicos con parafina fundida, se les colocó un casete de plástico, se agregó parafina fundida y se dejaron enfriar. Las muestras se cortaron longitudinalmente y transversalmente con respecto a la nervadura central a 6 μm de grosor en un micrótopo semiautomático (Thermo Scientific, Microm HM340E, GER). Las secciones obtenidas se tiñeron con safranina (Sigma) al 1 % en alcohol etílico al 50 % y verde-rápido (Sigma) al 1 % en etanol al 96 %, se montaron en resina Entellan (Merck) y se secaron durante 24 h (Casarrubias-Carrillo *et al.*, 2002). Las laminillas se observaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss Axiostar Imager A2 con cámara integrada para identificar los daños en tejido. Se realizaron 36 observaciones por muestra. Los apresorios se midieron con el software ZEN 2012 (blue edition).

Entre las 2 y 18 hdi sólo se observaron conidios de *C. truncatum* sin germinar en la superficie de la hoja. La germinación inició a partir de las 20 hdi, y en el extremo apical de los tubos germinativos se formaron apresorios melanizados de color café oscuro, de forma globosa a irregular, y de 7.67 x 5.26 μm en promedio (Figura 12A). *C. truncatum* formó apresorios melanizados para facilitar la adhesión y la penetración, por medio de acción mecánica y lisis enzimática (Kubo *et al.*, 2000). Las primeras hifas de infección emergieron de los apresorios a partir de las 24-48 hdi (Figura 12B). En el lapso de 24-60 hdi se observaron hifas intramurales, las cuales crecieron en las paredes celulares (Figura 12C). A las 60 hdi se observó el inicio del estado necrótrofo, ya que se observaron hifas intracelulares (Figura 12D); además, se observaron cavidades (Figura 12E), que de acuerdo con Pring *et al.* (1995) son indicativas de la degradación de paredes celulares. Los acérvulos (Figura 12E) se asociaron con la coloración oscura en la superficie del hospedante en contraste con la hoja testigo, la cual no presentó síntomas de enfermedad (Figura 12F). A las 96 hdi,

el patógeno completó su ciclo de vida al producir acérvulos con conidios, los cuales son la fuente de inóculo para infecciones en nuevos tejidos (Ranathunge *et al.*, 2012). El daño celular y la producción de acérvulos se asociaron con la aparición de lesiones oscuras semicirculares de coloración marrón a negro, al tercer día después de inoculación (Figura 13A), en contraste con la hoja testigo (Figura 13B).

La estrategia de infección de *C. truncatum* en hojas de chícharo fue distinta. Los conidios permanecieron sin germinar hasta las 12 hdi. A las 18 hdi, los tubos germinativos emergieron de manera polar y lateral. A partir de los tubos germinativos se formaron apresorios melanizados de color café oscuro, de forma globosa a irregular, y de 8.24 x 5.92 μm en promedio. Las primeras hifas de infección emergieron de los apresorios entre las 18 y 20 hdi a diferencia de lo que ocurrió en hoja de papaya (Figura 14A). Se observaron hifas lobuladas, ramificadas intracelulares (hifas primarias) de las 36 hdi hasta las 60 hdi (Figura 14B). A pesar de que las hifas primarias de infección se presentaron en el lumen celular, no se observó lisis. La principal característica de la invasión intracelular es la formación de hifas primarias de infección; éstas pueden tener diferente morfología según la especie (O'Connell *et al.*, 2000). La hifa primaria de *C. truncatum* es multilobulada, ramificada y grande (Latunde-Dada y Lucas, 2007). Durante el estado biótrofo, la hifa primaria se invaginó hacia el lumen celular (Figura 14B). De acuerdo con O'Connell *et al.* (2000), la hifa primaria forma una matriz interfacial compuesta de glicoproteínas ricas en prolina e hidroxiprolina que separa a la hifa de la membrana plasmática del hospedante.

Se observaron hifas de infección delgadas (hifas secundarias), las cuales emergieron de hifas primarias de infección a las 72 hdi (Figura 14C). Según Bhadauria *et al.* (2011), la transición del estado biótrofo al necrótrofo se asocia con el desarrollo de hifas secundarias delgadas, las cuales maceran los tejidos del hospedante. Las hifas secundarias colonizaron células de manera

intracelular, lo cual ocasionó daño celular con la formación de cavidades celulares (Figura 14D). De acuerdo con Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002) las cavidades celulares indican disolución celular. La formación de acérvulos inició a partir de las 96 hasta las 148 hdi y éstos contenían conidióforos, setas melanizadas y conidios (Figura 14E), en contraste con la hoja sana (Figura 14F). El daño celular se asoció con los síntomas de antracnosis (Figura 13C), en contraste con la hoja testigo, la cual no presentó síntomas (Figura 13D). A diferencia del estudio realizado por O'Connell *et al.* (1993), la cepa de *C. truncatum* utilizada en la presente investigación produjo acérvulos en chícharo. Los acérvulos con conidios se produjeron a partir de las 96 hdi, concluyendo así el ciclo de vida del patógeno. Los síntomas de antracnosis en hoja de chícharo a las 148 hdi fueron limitados en extensión, en contraste con los observados en papaya, probablemente debido a que la cepa originalmente se aisló de fruto de papaya.

CONCLUSIÓN

En este estudio se demostró que la cepa CCM de *C. truncatum* se comportó como patógeno intramural subcuticular en papaya y como hemibiótrofo intracelular en chícharo, por lo que el proceso de infección es dependiente del hospedante.

Agradecimientos A112I proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financiado por SAGARPA, al CONACyT por el financiamiento a los estudios de I. Rojo-Báez y a la Dra. Apolinar Santamaría Miranda del CIIDIR-IPN Sinaloa por su apoyo para realizar el análisis histopatológico en su laboratorio.

LITERATURA CITADA

Bhadoria V, Banniza S, Vandenberg A, Selvaraj G and Wei Y. 2011. Cataloging proteins putatively secreted during the biotrophy-necrotrophy

- transition of the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. Plant Signaling & Behavior. 6:1457-1459. Disponible en línea: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/psb.6.10.17700>
- Casarrubias-Carrillo U, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D y Gutiérrez-Alonso G. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Revista Mexicana de Fitopatología. 20: 88-93. Disponible en línea: <http://www.socmexfito.org/2013-06-19-02-09-15/001-vol-20/101-revista-smf/2002/001/234-histopatologia-de-frutos-de-papaya-carica-papaya-l-infectados-por-colletotrichum-gloeosporioides-penz>
- Diéguez-Uribeondo J, Förster H, Soto-Estrada A and Adaskaveg, JE. 2005. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. Phytopathology. 95:751-758. <http://dx.doi.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-0751>
- Kubo Y, Takano Y, Tsuji G, Horino O and Furusawa I. 2000. Regulation of melanin biosynthesis genes during appressorium formation by *Colletotrichum lagenarium* 99p. Prusky D, Freeman S and Dickman MB. (eds.). In: *Colletotrichum* Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. APS press, Minnesota, USA. 399 p.
- Latunde-Dada AO and Lucas JA. 2007. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. Plant Pathology. 56:437-44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01576.x/epdf>
- O'Connell RJ, Uronu AB, Waksman G, Nash C, Keon JPR and Bailey JA. 1993. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. Plant Pathology. 42:774-783. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01564.x>
- O'Connell RJ, Perfect S, Hughes B, Carzaniga R, Bailey J and Green J. 2000. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. 55-77p. Prusky D, Freeman S and Dickman MB. (eds.). In: *Colletotrichum* Host

specificity, pathology, and host-pathogen interaction. APS press, Minnesota, USA. 399 p.

- Pandey A, Pandey BK, Muthukumar M, Yadava LP and Chauhan UK. 2012. Histopathological study of infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc. on *Mangifera indica* L. Plant Pathology Journal. 11:18-24. <http://dx.doi.org/ppj.2012.18.24&linkid=pdf>
- Perfect SE, Hughes HB, O'Connell RJ and Green JR. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genetics and Biology. 27:186-198. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Pring RJ, Nash C, Zakaria M and Bailey JA. 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 46:137-152. <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.1995.1011>
- Ranathunge NP, Mongkolporn O, Ford R and Taylor PWJ. 2012. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defense mechanisms. Australasian Plant Pathology. 41:463-473. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-012-0156-0>
- Rodríguez-López ES, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Delgado S, Gutiérrez-Diez A y Mayek-Pérez N. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. Revista Brasileira de Fruticultura. 35:898-905. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n1/v27n1a7.pdf>
- Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Lappe P, Larque-Saavedra A and Pérez-Brito D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatán peninsula. Molecular Biotechnology. 40:293-298. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-008-9093-0>
- Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I and Pérez-Brito D. 2012. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L).

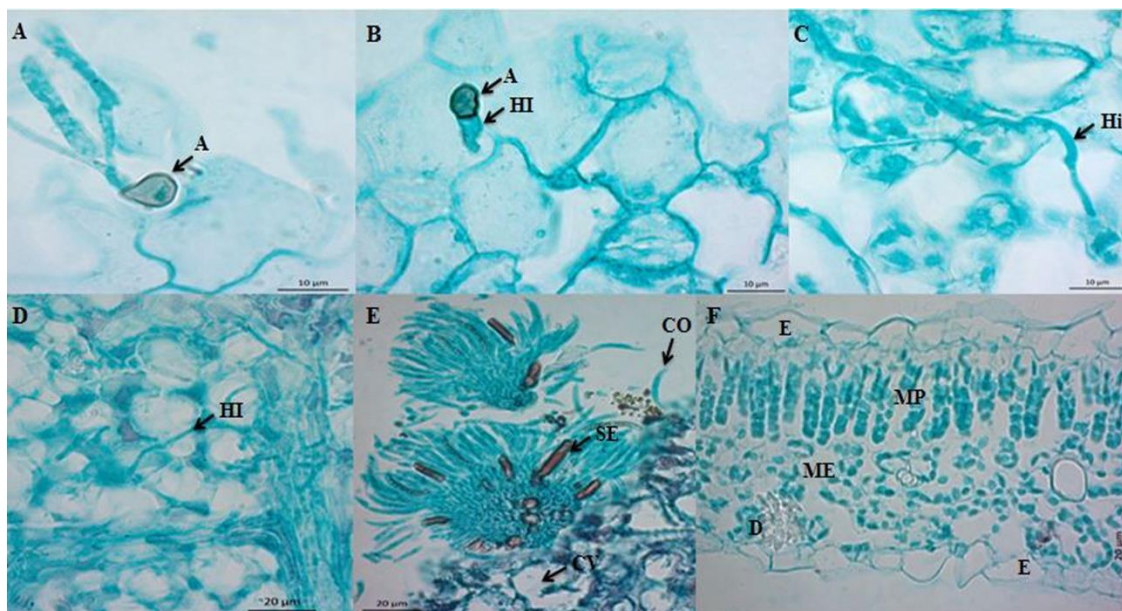


Figura 12. Microfotografías del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas escindidas de papaya cv. Maradol. A) Corte longitudinal de hoja a las 20 hdi, formación de apresorios melanizados (A) a partir de tubos germinativos polares de conidios. Barra = 10 μ m. B) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 24 hdi. Primeras hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A). Barra = 10 μ m. C) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 60 hdi. Hifa intramural (Hi). Barra = 10 μ m. D) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 60 hdi. Hifa intracelular (HI). Barra = 20 μ m. E) Corte transversal de hoja de papaya infectada por *C. truncatum* 96 hdi, formación de acérvulo en el hospedante, conidióforos (CO), setas incrustadas (SE) y cavidades (CV). Barra = 20 μ m. F) Corte transversal de hoja sana. Epidermis (E), mesófilo en empalizada (MP), mesófilo esponjoso (ME) y drusa (D). Barra = 20 μ m.

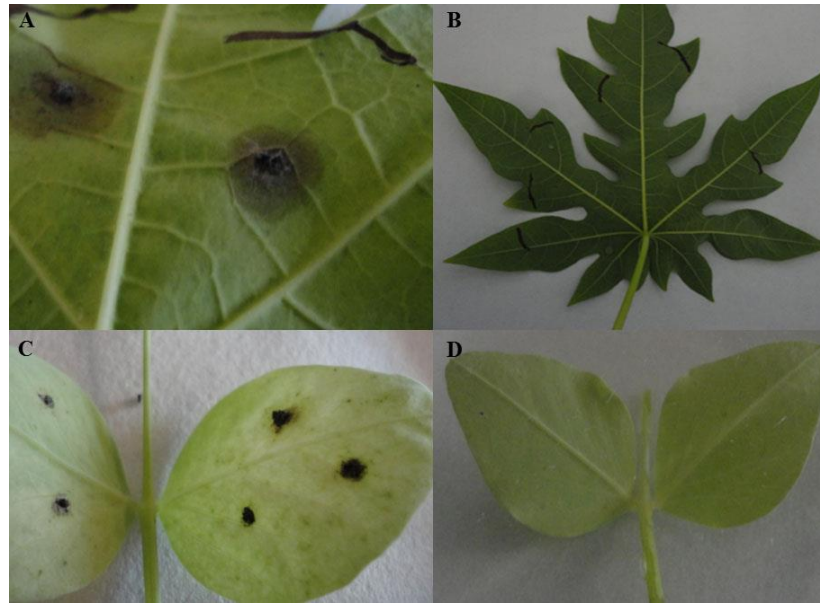


Figura 13. Síntomas de antracnosis ocasionados por la cepa CCM de *C. truncatum* en distintos hospedantes. A) Hoja de papaya Maradol con síntomas de antracnosis a las 148 hdi; B) Hoja de papaya testigo; C) Hoja de chícharo Lincoln con síntomas de antracnosis a las 148 hdi; D) Hoja de chícharo testigo.

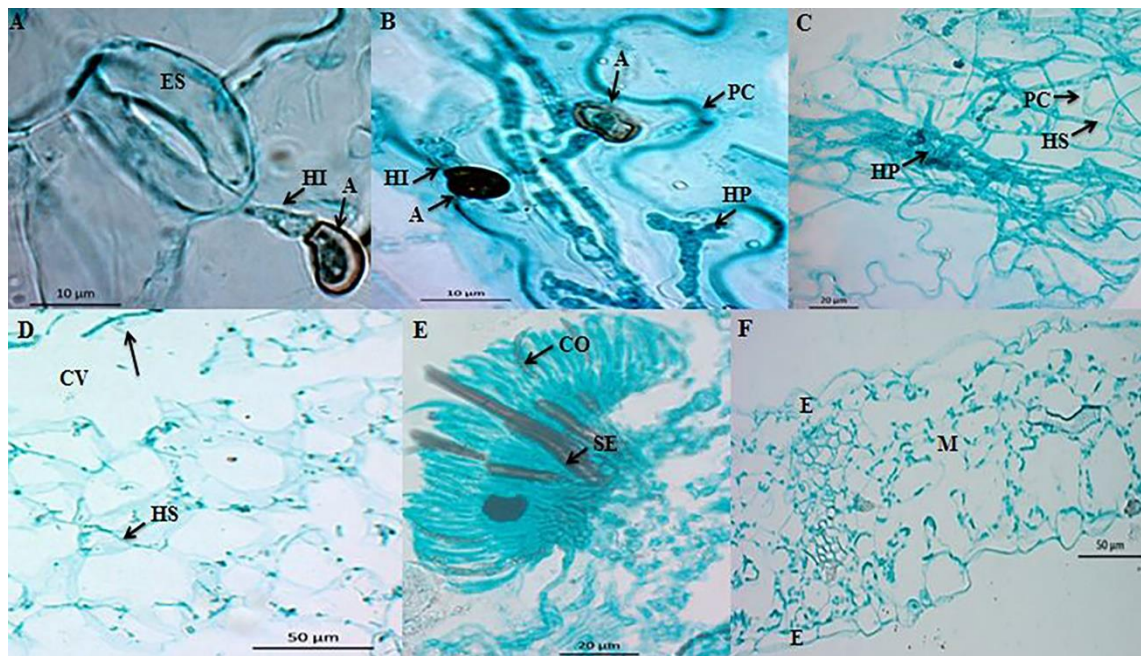


Figura 14. Microfotografías del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas escindidas de chícharo cv. Lincoln. A) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 18

hdi. Primeras hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A). Barra = 10 μm . B) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 36 hdi. Hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A), así como hifa primaria (HP) lobulada delimitada por la pared celular (PC) del hospedante. Barra = 10 μm . C) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 72 hdi. Hifas secundarias (HS) emergiendo de hifas primarias (HP), las cuales atraviesan las paredes celulares (PC) del hospedante. Barra = 20 μm . D) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 72 hdi. Hifas secundarias de infección (HS) invadiendo intracelularmente. Se observan cavidades (CV) durante el estado necrótrofo. Barra = 50 μm . E) Corte transversal de hoja de chícharo a las 96 hdi. Formación de acérvulo en la superficie del hospedante. Presencia de conidióforos (CO) y setas incrustadas (SE). Barra = 20 μm . F) Corte transversal de hoja sana. Epidermis (E) y mesófilo (M). Barra = 50 μm .

CAPÍTULO VI: CUARTO ARTÍCULO

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL PROCESO DE
INFECCIÓN DE *Colletotrichum truncatum* EN HOJAS DE PAPAYA
MARADOL

**Indira Rojo-Báez¹, Raymundo Saúl García-Estrada¹, Josefina León-Félix¹,
Adriana Sañudo-Barajas¹, Raúl Allende-Molar^{1*}**

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación Culiacán. Carr. Culiacán-Eldorado km 5.5, Campo el Diez, CP. 80110, Culiacán, Sinaloa, México. Tel: +52 (667)760 5536/37/38. *Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Artículo para enviar a la revista: Agrocienza

RESUMEN

Colletotrichum truncatum es un hongo patógeno agente causal de antracnosis en hojas de papaya (*Carica papaya* L.). El objetivo de este trabajo fue determinar la evolución de la expresión de genes relacionados con la patogenicidad de *C. truncatum* en su interacción con hojas de papaya Maradol. Para estudiar su estado patogénico, se inocularon esporas en hojas escindidas de papaya y se analizaron muestras de tejidos inoculados a las 0, 2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 y 120 hdi. Se midió la expresión relativa progresiva de quitin sintasa (*CHS1*), β -1-3 glucan sintasa (*GLS1*) y cutinasa (*CUT1*). El gen *CHS1* se expresó a partir de las 2 hdi a niveles más sobresalientes de las 2 a 6 hdi; el perfil de expresión del gen *GLS1* coincidió con *CHS1*, pero además tuvo un valor de expresión alto a las 120 hdi; la expresión del gen *CUT1* fue considerada tardía ya que se registró a partir de las 20 hdi y con un valor máximo a las 120 hdi. Estos genes están relacionados a la producción de estructuras de infección y desarrollo del patógeno durante el proceso de infección en hojas de papaya Maradol, sugiriendo que la síntesis de quitina y β -1-3 glucanos se asocia a la etapa de producción de estructuras de infección (aprosorios, hifas de infección, conidios y acérvulos) mientras que la cutinasa cumple una función posterior posiblemente para la lisis de la cutícula del hospedante.

Palabras clave: *C. truncatum*, papaya, quitin sintasa, β -1-3 glucan sintasa, cutinasa.

INTRODUCCIÓN

Colletotrichum truncatum es un hongo fitopatógeno agente causal de antracnosis en diversos hospedantes, entre los que se encuentran papaya (*Carica papaya*), chícharo (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*), lenteja (*Lens culinaris*), chile (*Capsicum annuum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), cacahuate (*Arachis hypogaea*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (O'Connell et al., 1993; Pring et al., 1995; Latunde-Dada y Lucas, 2007; Tapia-Tussell et al., 2008; Ranathunge

et al., 2012). En México, la antracnosis afecta seriamente al cultivo de papaya, ya que es la principal enfermedad poscosecha, produciendo pérdidas de hasta 50%. *C. truncatum* es uno de los agentes causales de antracnosis en México y presenta una incidencia de 40% en frutos de papaya (Tapia-Tussell et al., 2008; Torres-Calzada et al., 2012).

El patógeno utiliza distintas estrategias de infección para ocasionar antracnosis en sus hospedantes. Durante este proceso, se presentan los eventos de adhesión, germinación, penetración, estado biotrófico y/o estado necrótrofo (Perfect, 1999). En especies de *Colletotrichum* se han estudiado genes relacionados a patogenicidad; durante el proceso de infección el patógeno requiere de estructuras especializadas como los apresorios e hifas de infección para llevar a cabo la infección de forma exitosa (O'Connell et al., 2012).

Se han reportado las proteínas quitin sintasa y β -1-3 glucan sintasa como mediadoras de patogénesis por su función en la producción de quitina y β -glucanos, respectivamente, componentes indispensables de la pared celular fúngica y estructuras infectivas. La quitina es un polímero de N-acetilglucosamina que representa el principal componente de la pared celular fúngica, le brinda rigidez y es esencial para el crecimiento vegetativo del hongo. La síntesis de quitina se lleva a cabo por la enzima glicosil transferasa denominada quitin sintasa (*CHS1*), la cual es primordial para la producción de estructuras infectivas y la colonización del patógeno en su hospedante, puesto que se requiere sintetizar pared celular para producir apresorios durante la penetración, hifas de infección durante el estado necrótrofo, así como la producción de conidios dentro de acérvulos durante la reproducción y dispersión (Werner et al., 2007).

Otro componente esencial de la pared celular fúngica es el β -1-3 glucano, polisacárido sintetizado por la enzima β -1-3 glucan sintasa (*GLS1*). En hongos patógenos, la regulación de la formación de polímeros de pared celular es importante, así como el cambio estructural durante la morfogénesis relacionada al proceso de infección; la β -1-3 glucan sintasa (*GLS1*) se requiere en la rigidez

de la pared celular del apresorio, la formación de hifas en células del hospedante y el establecimiento de comunicación y compatibilidad en la interacción planta-patógeno (Oliveira-García et al., 2013).

Una etapa importante del proceso de infección es la penetración, en la cual se producen apresorios que rompen la cutícula del hospedante mediante fuerza mecánica. Además, pueden participar enzimas que faciliten la entrada del patógeno en las células vegetales. La cutinasa es la enzima implicada en degradación de la cutícula vegetal, ya que actúa sobre los monómeros de cutina. La expresión del gen (*CUT1*), el cual codifica la enzima cutinasa, durante la penetración de *C. truncatum* en chile, facilita la entrada del patógeno en hojas (Auyong et al., 2015). Existen estudios del proceso de infección de *C. truncatum* en distintos hospedantes a nivel histológico; sin embargo, la información relacionada con la expresión de genes de patogenicidad de esta especie son escasas. El objetivo de este estudio es determinar los niveles de expresión de los genes que codifican para quitin sintasa, β -1-3 glucan sintasa y cutinasa en su interacción con papaya Maradol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó la cepa CCM de *Colletotrichum truncatum* previamente caracterizada (KF147902). El material vegetal consistió en hojas escindidas de papaya de ocho meses de edad.

Se colectaron al azar 50 hojas sanas completamente desarrolladas de árboles de papaya Maradol de ocho meses de edad en Balbuena, Navolato. Las hojas se lavaron con agua corriente, se secaron y se desinfectaron con alcohol al 70% y se colocaron en cámara húmeda (bolsas de plástico de 50 x 80 cm con papel absorbente humedecido con agua destilada); posteriormente, se asperjó 30 mL de una suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6

esporas/mL en haz y envés de hojas de papaya. La inoculación se llevó a cabo sin ocasionar heridas (Auyong et al., 2015).

Los muestreos de tejido vegetal se realizaron a las 0, 2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 y 120 horas después de inoculación (hdi). Las muestras se colocaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su uso posterior. El experimento se realizó por triplicado.

Manipulación de ácidos nucleicos

El ARN total de la etapa patogénica (0 hasta 120 hdi) se extrajo utilizando el método de Trizol (Tri Reagent, SIGMA, USA); la concentración de ARN total se determinó espectrofotométricamente (NanoDrop, ThermoScientific, USA) y su integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Se eliminó el ADN genómico presente en las muestras de ARN mediante DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después se realizó la transcripción reversa de 1 μL de ARN total en un volumen de reacción de 20 μL usando 100 U de SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN complementario (ADNc) se cuantificó mediante espectrofotometría (NanoDrop, ThermoScientific, USA) y se diluyó en agua nanopura hasta obtener una concentración de 125 ng/ μL .

Expresión génica relativa

Se diseñaron iniciadores para los genes de interés en base a regiones parciales de CHS1 y GS. Se amplificó la región genómica CHS1 de *C. truncatum* de acuerdo a los iniciadores reportados por Jiang et al. (2014); se amplificó la región genómica GS de *C. truncatum*, posteriormente los amplicones se secuenciaron y se diseñaron los iniciadores mediante el software PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), tanto los iniciadores directos como inversos se diseñaron sobre la región del exón del gen (Cuadro 4) (NCBI, 2017). Como análisis confirmatorio, se alinearon las

secuencias de los iniciadores diseñados utilizando el software ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). Se utilizaron iniciadores previamente reportados para los genes endógenos y el gen de interés cutinasa. Para comprobar la especificidad de los iniciadores, el ADNc a una concentración de 500 ng/ μL^{-1} se diluyó en serie siete veces en una proporción 1:2. La reacción de qPCR se realizó durante 39 ciclos junto con la curva de fusión por triplicado. Se realizó una gráfica semi-logarítmica CT versus la dilución. La eficiencia del iniciador se calculó usando la fórmula $e=10^{(-1/\text{pendiente})}$; un iniciador con una pendiente de -3.321 posee 100% de eficiencia (Bustin et al., 2009), los iniciadores con un nivel de eficiencia de 90-110% se eligieron para el análisis de expresión génica (Material suplementario).

Cuadro 4. Iniciadores para qPCR empleados en el estudio.

Nombre	Producto génico	Secuencia 5' - 3'	Referencia	Amplicón (pb)
Ct60SF	Gen ribosomal	TCGTTGTTGGTCTTGTGGG	Bhadauria et al., 2013	200
Ct60SR		ATCTTGTGGTTGACAGAGGT		
Tef-F	Factor de elongación 1 α	AGGACGACAAGACTCACATC	Fang et al., 2006	268
Tef-R		G TTCAGCGGCTTCCTTCTC		
CUT1-F	Enzima cutinasa 1	TCTGTTCCGGCTACACCAAGAA	Auyong et al., 2015	136
CUT1-R		CAAGAAATGCGCCGGCAGGAT		
CHS1-F	Enzima quitin sintasa 1	GCAGCAGGTCAACAACAAGG	Este estudio	102
CHS1-R		TGCTTGGGGATCAAGGTGAC		
GLS1-F	Enzima β -1,3 glucan sintasa	ACGAAAGTCCGCATCCACTT	Este estudio	133

El análisis de expresión se realizó mediante la plataforma de detección en tiempo real CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA) para cuantificar la expresión de los genes de interés: cutinasa (*CUT1*), quitin sintasa (*CHS1*) y β -1,3 glucan sintasa (*GLS1*) en estado patogénico; así como los genes endógenos el gen ribosomal (*60S*) y factor de elongación (*TEF*).

Las mezclas de reacción consistieron en 5 μ L de SYBR Green Master Mix (Bio-Rad, Hercules, CA), 300 nM de cada iniciador endógeno (*60s* y *tef*) y 750 nM de cada iniciador de los genes de interés cutinasa, quitin sintasa y β -1-3 glucan sintasa y 2 μ L de templado. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación: Pre calentamiento 95 °C 5 min, seguido de 39 ciclos de 95 °C 30 s, 55.7 °C 30 s (*TEF*), 55.2°C 30 s (*60S*), 62.9° C 30 s (*CUT1*), 63°C 30 s (*CHS1*), 57.5°C 30 s (*GLS1*), 72 °C 30 s y una Melt Curv de 60 °C a 95 °C 0.05-0.5 °C.

Para la normalización, los valores del ciclo de umbral (CT) de los genes endógenos se restan del correspondiente valor CT del gen de interés, produciendo valores DeltaCT. Los valores de CT se determinaron en base a tres repeticiones técnicas, el experimento se replicó dos veces. Los niveles de expresión relativos de los genes de interés (*CUT1*, *GLS1* y *CHS1*) se normalizaron contra los genes endógenos (*TEF* y *60S*) y la cantidad relativa del producto amplificado se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando el valor CT obtenido del tiempo cero como calibrador (Livak y Schmittgen, 2001).

Diseño Experimental

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, con un solo factor (tiempo en hdi) con 11 niveles (0, 2, 6, 16, 20, 24, 48, 60, 72, 96 y 120 hdi), así como el tiempo cero como control; la variable de respuesta fue el nivel de expresión relativa de los genes (*CHS1*, *GLS1* y *CUT1*). Se utilizó el

programa estadístico Minitab 17; se realizó la comparación de medias mediante el método estadístico de Dunnet con nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se investigaron los niveles de expresión relativa de tres genes relacionados a patogenicidad *CUT1*, *GLS1* y *CHS1* en interacción con hojas de papaya Maradol, los cuales codifican para las enzimas cutinasa, β -1,3 glucan sintasa y quitin sintasa en *C. truncatum*, respectivamente. Se evaluó la especificidad de los pares de iniciadores para los genes de interés *CUT1*, *GLS1*, *CHS1* y los genes endógenos *TEF* y *60S*. Se comprobó la especificidad de los amplicones al obtener un único amplicón en la curva de fusión. Además, la eficiencia de los iniciadores para el gen *CUT1* fue de 90-97%, para el gen *GLS1* de 93-106% y para el gen *CHS1* de 90-95%. La eficiencia de los iniciadores fue la adecuada considerando que debe estar entre 90 y 110% (Bustin et al., 2009; Brookman-Amisshah et al., 2015).

El gen *CUT1* de *C. truncatum* en estado patogénico inició la expresión a partir de las 20 hdi. El nivel de expresión del gen se mantuvo constante desde las 20 hasta las 72 hdi, a las 96 hdi se observó un incremento en los niveles de expresión (82 veces más que el control); sin embargo, estadísticamente no hubo diferencia significativa entre las 20 y las 96 hdi. Por otra parte, sorprendentemente se observó una elevación del nivel de transcrito génico estadísticamente significativa a las 120 hdi (435 veces más que el control) (Fig 15A).

La expresión de *CUT1* en hojas de papaya Maradol a las 20 hdi puede deberse al inicio de la penetración de *C. truncatum* en este hospedante. La cutinasa es una esterasa que hidroliza los monómeros de cutina de la cutícula del hospedante, lo que desencadena señales moleculares para la formación del apresorio durante el proceso de penetración; además, las cutinasas también están implicadas en la adhesión y germinación de conidios (Vidhyasekaran,

2008). La expresión de este gen coincide con las etapas de germinación y formación de apresorios (etapa de penetración) durante el proceso de infección de *C. truncatum*, en hoja de papaya (Rojo-Báez et al., 2016). Además, Auyong et al. (2015) reportaron la expresión del gen cutinasa en la interacción *C. truncatum*-chile durante las primeras horas de infección (6 a 24 hdi), etapa en que *C. truncatum* emplea estrategias enzimáticas para la penetración en hojas de chile. La expresión del gen cutinasa coincide con la etapa de germinación y formación de apresorios de *C. truncatum* en su interacción con chile.

CUT1 se sobreexpresó a las 120 hdi (estado necrótrofo) (Fig. 15B), posiblemente debido a que el *C. truncatum* rompe la cutícula de su hospedante en la etapa de reproducción y dispersión durante el proceso de infección. Los antecedentes sobre la medición de los niveles de expresión de cutinasa durante el estado necrótrofo del proceso de infección son escasos, debido a que esta enzima se asocia principalmente a los eventos iniciales (adhesión, germinación y penetración); no obstante, en nuestro estudio se observó la elevación del nivel de transcrito de este gen al final del proceso de patogénesis. De acuerdo con Rojo-Báez et al. (2016), durante el estado necrótrofo del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas de papaya, se observó la formación de conidios dentro de acérvulos, los cuales emergieron de la cutícula del hospedante desde las 96 hasta las 148 hdi. Durante esta etapa el patógeno se desarrolló y se reprodujo para finalmente poder dispersarse. En el estado necrótrofo puede requerirse la producción de cutinasa, ya que por ejemplo los acérvulos de *Colletotrichum* spp. contienen una matriz mucilaginosa que envuelve a los conidios, los cuales segregan cutinasa extracelular para romper la cutícula de su hospedante, lo que facilita el proceso de dispersión del patógeno (Bergstrom y Nicholson, 2000).

Por otra parte, el gen *GLS1* de *C. truncatum* inició la sobreexpresión a partir del contacto del patógeno con el hospedante y durante las primeras horas (2 a 6 hdi) hasta 230 veces más con respecto al control, después disminuyó la expresión durante las 16 a 96 hdi y finalmente, se sobreexpresó a las 120 hdi (405 veces más) durante el estado patogénico con respecto al control, siendo

estadísticamente significativa la sobreexpresión del gen durante las primeras y últimas horas después de inoculación (Fig. 16A).

La expresión del gen *GLS1* en hojas de papaya Maradol inició a partir del contacto del patógeno con su hospedante. El β -1-3 glucano constituye el principal componente de la pared celular; por lo tanto, la síntesis de β -1-3 glucano por la β -1-3 glucan sintasa es necesaria para la formación de pared celular y el desarrollo normal de los hongos (Bowman y Free, 2006; Fesel y Zuccaro, 2016).

La expresión de *GLS1* se ha relacionado a patogenicidad en *Colletotrichum graminicola*, ya que durante su interacción con maíz se sobreexpresó a las 12 y 72 hdi, coincidiendo con el periodo temprano de infección donde la síntesis de β -1-3 glucanos indispensable en la rigidez de la pared celular de los apresorios, la esporulación asexual, la adhesión y la diferenciación del apresorio funcional, así como para el crecimiento rápido de hifas de infección secundarias durante el estado necrótico (Oliveira-García et al., 2013).

En este estudio, la expresión de *GLS1* durante las últimas horas de infección (120 hdi) (Fig 16B) sugiere que el patógeno requiere de la producción de β -1-3 glucanos durante el estado necrótico para la producción de estructuras de infección como hifas de infección y conidios. De acuerdo con Rojo-Báez et al. (2016), durante el estado necrótico del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas de papaya, se observó la colonización del patógeno mediante hifas secundarias de infección, así como la formación de conidios dentro de acérvulos desde las 96 hasta las 148 hdi.

El gen *CHS1* de *C. truncatum* en estado patogénico inició la expresión con significancia estadística durante las primeras horas de infección (2-6 hdi) con respecto al control (tiempo cero); no obstante, aunque no fue estadísticamente significativo se observó una tendencia de sobreexpresión del gen durante las 48-60 hdi y las últimas horas de infección (120 hdi) (Fig. 17A).

La expresión de *CHS1* de *C. truncatum* en hojas de papaya Maradol inició a partir de las 2 hdi. La síntesis de quitina está mediada por la quitin sintasa, una enzima integral de membrana asociada a la biosíntesis de quitina, la cual es uno de los principales componentes de la pared celular fúngica que brinda integridad estructural (Bowman y Free, 2006; Fesel y Zuccaro 2016; Lui et al., 2017).

El gen *CHS1* usualmente se utiliza como marcador molecular para la identificación de *Colletotrichum* spp. (Hyde et al., 2014), sin embargo también se ha relacionado con patogenicidad en *Colletotrichum graminicola*. De acuerdo con Werner et al. (2007), el gen quitin sintasa 1 de *C. graminicola* se sobreexpresó a las 48 (etapa de formación de apresorios) y 72 hdi (estado necrótrofo) durante el proceso de infección en hoja de maíz, siendo mayor la expresión durante el estado necrótrofo; la quitina se requiere para la formación de estructuras de infección como los apresorios e hifas de infección.

A pesar de que la expresión del gen quitin sintasa durante las últimas horas de infección (120 hdi) no fue estadísticamente significativa, se observó una notoria elevación de los niveles de transcrito (Fig 17B), que posiblemente esté relacionada con la necesidad de proveer estabilidad a la pared celular de hifas secundarias de infección, acérvulos y conidios. De acuerdo con Rojo-Báez et al. (2016), durante el estado necrótrofo del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas de papaya (120 hdi), se observó la producción de hifas secundarias de infección, acérvulos y conidios.

CONCLUSIONES

En este estudio se analizaron los niveles de expresión relativa temporal de algunos genes de *Colletotrichum truncatum* relacionados a la producción de estructuras de infección y desarrollo del patógeno durante su interacción con hojas de papaya Maradol. La temporalidad de máxima expresión de los genes

de virulencia de *C. truncatum* fueron *CUT1* durante el estado necrótrofo (120 hdi), *GLS1* durante las etapas de germinación, penetración y estado necrótrofo (2, 6 y 120 hdi) y, *CHS1* durante las etapas de germinación y penetración (entre las 2 y 6 hdi).

REFERENCIAS

- Auyong A. S. M., Ford R. and Taylor P. W. J. 2015. The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology & Microbiology* 6:259.
- Bergstrom, G. C., and R. L. Nicholson. 2000. The biology of *Colletotrichum graminicola* and maize anthracnose, p. 374-394. In D. Prusky, S. Freeman, and M. B. Dickman (ed.), Host specificity, pathology and host pathogen interaction of *Colletotrichum*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Bhadauria V., Banniza S., Vandenberg A., Selvaraj G. and Wei Y. 2013. Overexpression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. *Eukaryotic Cell*. 12:2-11.
- Bowman S. M. and Free S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799-808.
- Brookman-Amisshah N, Packer H., prediger E and Sabel J. 2015. qPCR application guide: experimental overview, protocol, troubleshooting. Fourth edition. Integrated ADN Technologies, Bélgica. Pp 46-49.
- Bustin S.A., Benes V, Garson J.A., Hellemans J, Huggett J., et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.

- Fang W and Bidochka M.J. 2006. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research* 110:1165-1171.
- Fesel P. H. and Zuccaro A. 2016. B-glucan: crucial component of the fungal cell Wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology* 90:53-60.
- Hyde KD, Nilsson RH, Alias SA, Ariyawansa HA, Blair JE, et al. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity* 67:21-125.
- Jiang J, Zhai H, Li H, Wang Z, Chen Y, Hong N, Wang G, Chofong GN and Xu W. 2014. Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Cop Protection* 58:41-48.
- Latunde-Dada A. O and Lucas J. A. 2007. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. *Plant Pathology* 56:437-447.
- Liu R., Xu C., Zhanf Q. and Fang W. 2017. Evolution of the chitin synthase gene family correlates with fungal morphogenesis and adaptation to ecological niches. *Scientific Reports* 7:44527.
- Livak K.J and Shmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.
- NCBI, 2017. National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov. Consultado el 21 de Abril de 2017.
- O'Connell R.J., Uronu A.B., Waksman G., Nash C., Keon JPR and Bailey J.A. 1993. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology* 42:774-783.

- O'Connell R.J., Thon M.R, Hacquard S, Amyotte S.G, Kleemann J, Torres M.F, et al. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* 44:1060-1067.
- Oliveira-García E. and Deising H. B. 2013. Infection structure-specific expression of β -1-3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of β -glucan-triggered immunity in maize. *The Plant Cell* 25:2356-2378.
- Perfect S.E., Hughes H.B., O'Connell R.J. and Green J.R. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198.
- Pring R.J, Nash C., Zakaria M. and Bailey J.A. 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46:137-152.
- Ranathunge N.P., Mongkolporn O., Ford R. and Taylor P.W.J. 2012. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defense mechanisms. *Australasian Plant Pathology* 41:463-473.
- Rojo-Báez I, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2016. Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 316-325.
- Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Lappe P, Larque-Saavedra A and Pérez-Brito D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatán peninsula. *Molecular Biotechnology*. 40:293-298.

Torres-Calzada C., Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I. and Pérez-Brito D. 2012. Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.). European Journal of Plant Pathology 135:67-79.

Vydhyasekaran, P. 2008. Fungal pathogenesis in plants and crops: Molecular biology and host defense mechanisms. CCR press, Florida, USA. Pp. 14-15.

Werner S., Sugui J.A., Steinberg G. and Deising H.B. 2007. A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. Molecular Plant-Microbe Interactions 20:1555-1567.

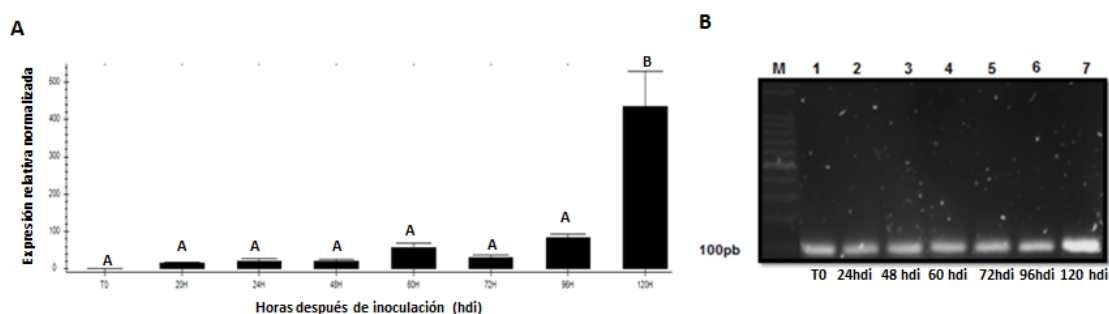


Figura 15. Expresión relativa de los transcritos del gen *CUT1* de *C. truncatum* en diferentes horas después de inoculación (hdi). A) Expresión relativa normalizada con los genes endógenos *TEF* y *60S* (Livak y Schmittgen, 2001). Las barras en la gráfica representan los errores estándar de dos experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticas de acuerdo a análisis de varianza (anova). Los datos son derivados de dos réplicas biológicas por muestra por experimento. B) Gel de agarosa al 1%, marcador molecular 100 pb (promega), carril 1: tiempo cero, carril 2 al 7: transcritos de 24 a 120 hdi.

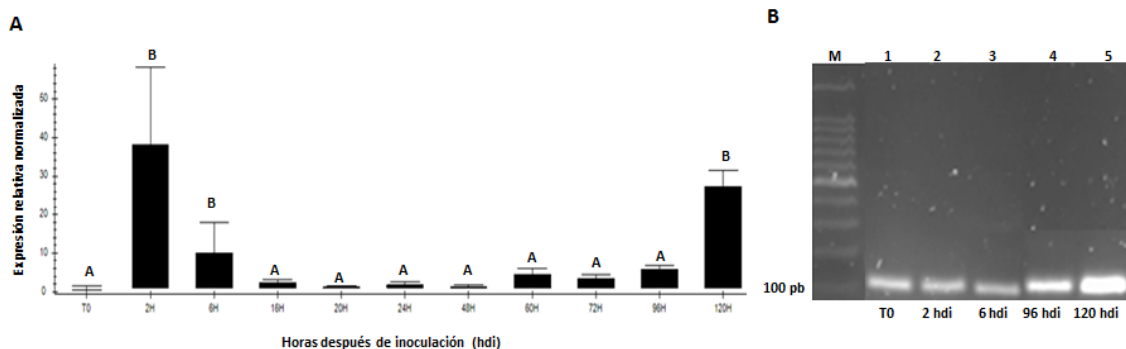


Figura 16. Expresión relativa de los transcritos del gen *GLS1* de *C. truncatum* en diferentes horas después de inoculación (hdi). A) Expresión relativa normalizada con los genes endógenos *TEF* y *60S* (Livak y Schmittgen, 2001). Las barras en la gráfica representan los errores estándar de dos experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticas de acuerdo a análisis de varianza (anova). Los datos son derivados de dos réplicas biológicas por muestra por experimento. B) Gel de agarosa al 1%, marcador molecular 100 pb (promega), carril 1: tiempo cero, carril 2 al 6: transcritos de 2 a 120 hdi.

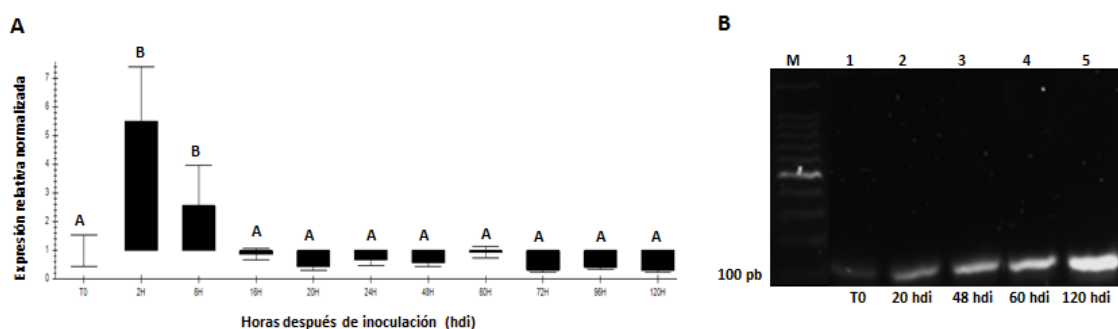
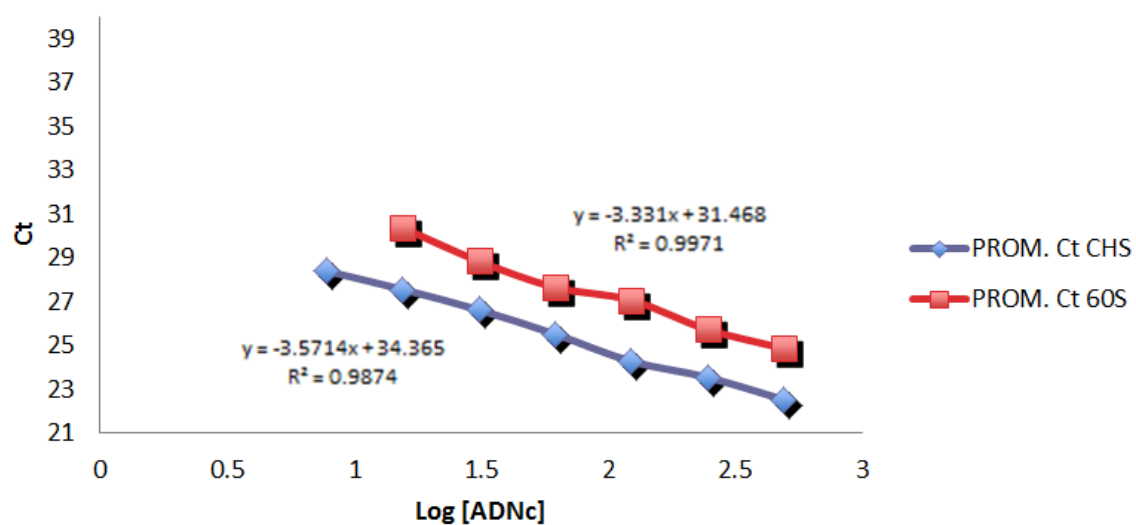


Figura 17. Expresión relativa de los transcritos del gen *CHS1* de *C. truncatum* en diferentes horas después de inoculación (hdi). A) Expresión relativa normalizada con los genes endógenos *TEF* y *60S* (Livak y Schmittgen, 2001). Las barras en la gráfica representan los errores estándar de dos experimentos independientes. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticas de acuerdo a análisis de varianza (anova). Los datos son derivados de dos réplicas biológicas por muestra por experimento. B) Gel de agarosa al 1%, marcador molecular 100 pb (promega), carril 1: tiempo cero, carril 2 al 6: transcritos de 20 a 120 hdi.

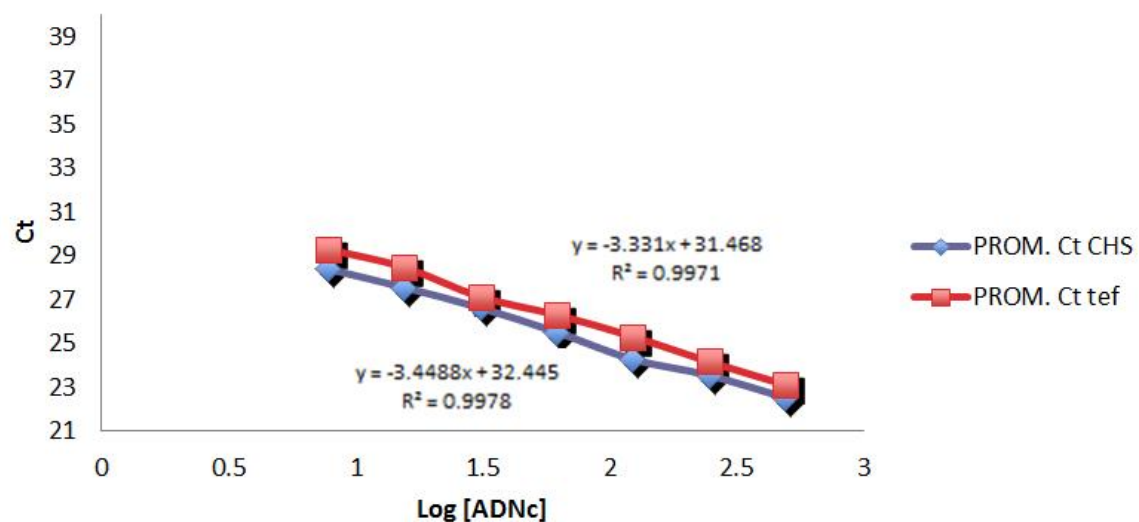
MATERIAL SUPLEMENTARIO

Eficiencia de iniciadores CHS1 respecto a iniciadores endógenos

El porcentaje de eficiencia de los iniciadores CHS1 y ct60s fue de 90.5% y 100%, respectivamente.

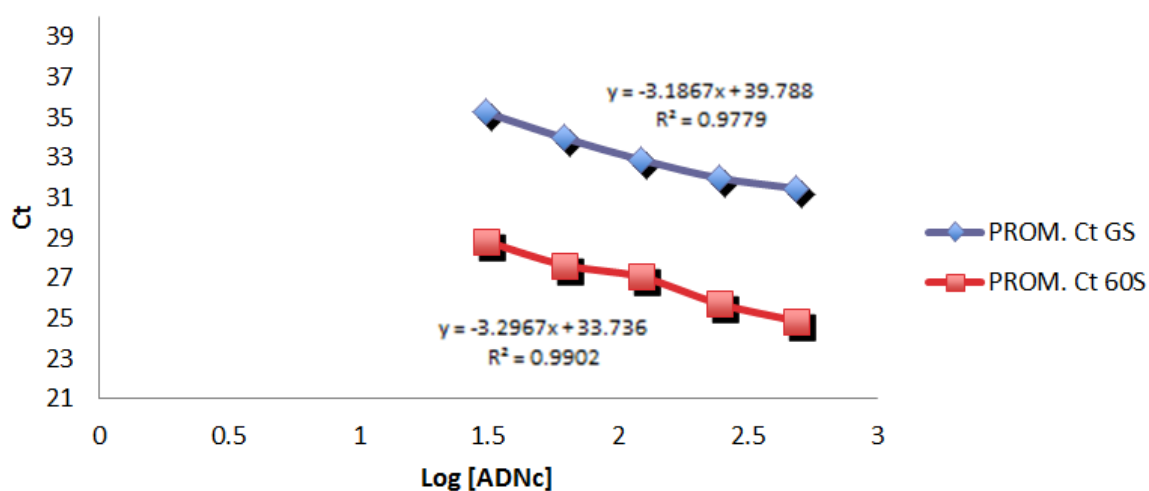


El porcentaje de eficiencia de los iniciadores CHS1 y tef fue de 95.2% y 100%, respectivamente.

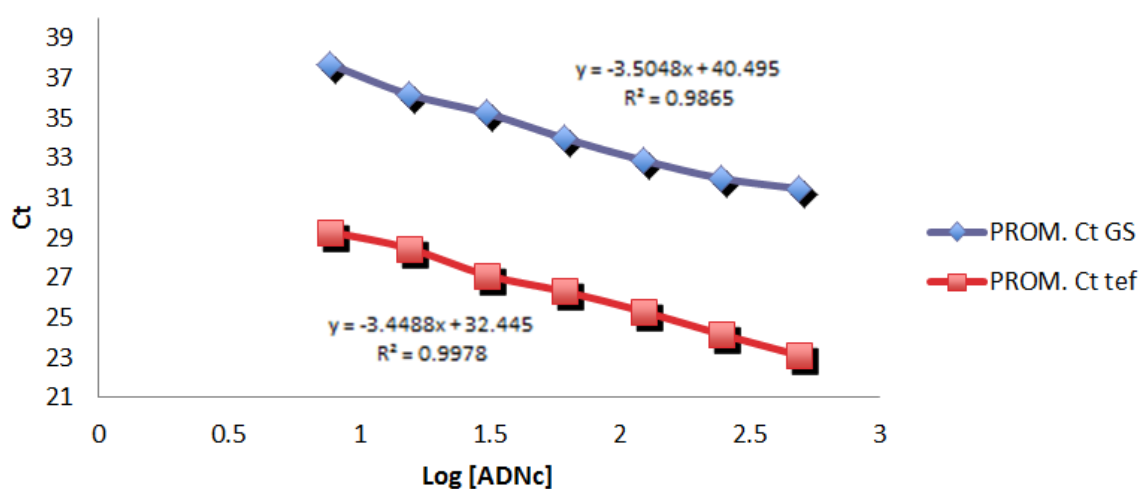


Eficiencia de iniciadores GLS1 respecto a iniciadores endógenos

El porcentaje de eficiencia de los iniciadores GLS1 y ct60s fue de 106% y 100%, respectivamente.

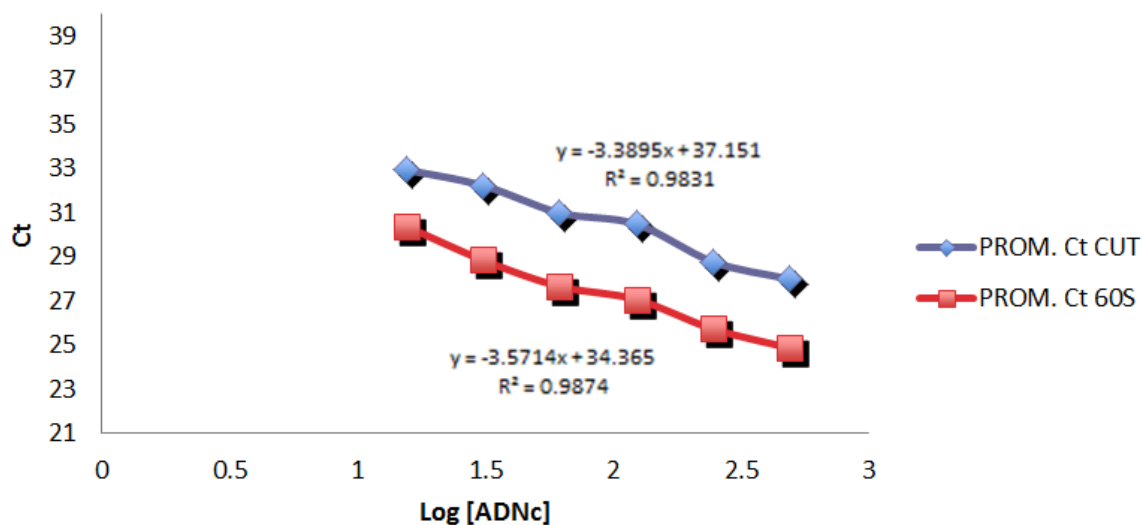


El porcentaje de eficiencia de los iniciadores GLS1 y tef fue de 93% y 100%, respectivamente.

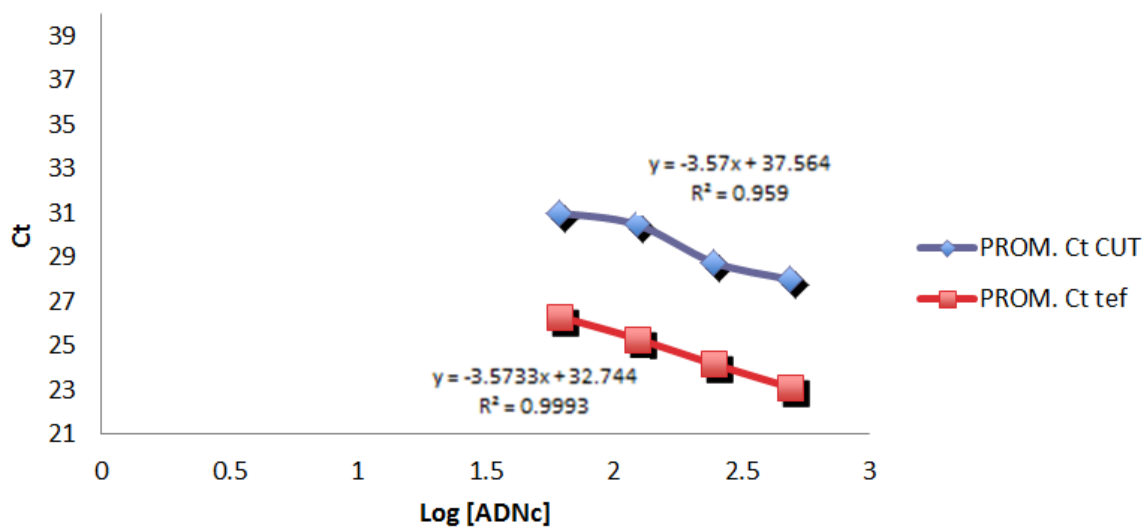


Eficiencia de iniciadores CUT1 respecto a iniciadores endógenos

El porcentaje de eficiencia de los iniciadores CUT1 y ct60s fue de 97.6% y 100%, respectivamente.



El porcentaje de eficiencia de los iniciadores CUT1 y tef fue de 90.5% y 100%, respectivamente.



CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES GENERALES

En este capítulo se presenta una integración de los principales resultados y conclusiones que se abordaron en esta investigación. Además, se presentan los apartados: alcances y limitaciones y perspectivas futuras.

La patogénesis de *Colletotrichum truncatum* en papaya Maradol implica conocer el origen y desarrollo de la antracnosis en su hospedante. En los objetivos propuestos en esta investigación, se planteó analizar el proceso de infección de *C. truncatum* en papaya Maradol mediante técnicas histológicas y moleculares.

De acuerdo a los primeros objetivos planteados, se describió el proceso de infección de *C. truncatum* en fruto y hoja de papaya Maradol mediante técnicas histológicas. En ambos órganos vegetales, la estrategia de infección empleada por el patógeno fue colonización intramural subcuticular; la cual se llevó a cabo de la siguiente manera: durante las primeras horas de inoculación (20-30 hdi) se observó la germinación de conidios y la formación de apresorios (etapas de germinación y penetración), durante las 24 a 72 hdi se observó colonización subcuticular, crecimiento intercelular y degradación celular (etapa de colonización por parte del patógeno); finalmente, durante el periodo de 96 a 120 hdi se observaron hifas secundarias de infección (estado necrótrofo) y la producción de acérvulos, los cuales emergieron de la epidermis del hospedante (reproducción del patógeno).

En el último objetivo de esta investigación, se determinaron los niveles de expresión relativa temporal de genes relacionados al proceso de infección intramural subcuticular de *C. truncatum* en hoja de papaya Maradol (cutinasa, β 1-3 glucan sintasa y quitin sintasa) mediante análisis de expresión génica. Durante el proceso de infección, el gen *CUT1* elevó el nivel de transcritos a las 120 horas después de inoculación, el gen *GLS1* a las 2, 6 y 120 horas después

de inoculación y, el gen *CHS1* entre las 2 y las 6 horas después de inoculación durante el proceso de infección en hojas de papaya Maradol.

Al integrar los resultados de los objetivos planteados, podemos conocer el proceso de infección de *C. truncatum* en hoja de papaya Maradol a nivel histológico y molecular (Fig 18). La etapa de adhesión, germinación y penetración se llevó a cabo durante las primeras horas de inoculación (2 a 24 hdi). En esta etapa, se observó la germinación de los conidios mediante tubos germinativos, así como la producción de apresorios melanizados; además, se sobreexpresaron los genes β -1-3 glucan sintasa y quitin sintasa, los cuales codifican para la formación de polímeros importantes de la pared celular como β -1-3 glucanos y quitina, lo que pudo permitirle al patógeno formar tubos germinativos y producir una pared celular funcional para los apresorios. En esta etapa también inició la expresión del gen cutinasa; donde el patógeno, mediante actividad enzimática, pudo penetrar con éxito la cutícula de papaya. En el lapso de 24 a 72 hdi; se observó colonización por parte del patógeno, en esta etapa la expresión de los genes *CUT1*, *GLS1* y *CHS1*, sugiere la participación de las enzimas cutinasa, β -1-3 glucan sintasa y quitin sintasa para que el patógeno pueda desarrollarse y dispersarse mediante hifas de infección. Finalmente, durante las 96 a 120 hdi se observaron hifas secundarias de infección y formación de acérvulos; en esta etapa se observó la colonización y reproducción de *C. truncatum*, así mismo la elevación de los niveles de transcrito de los genes *CUT1* y *CHS1* asociados a la ruptura de la cutícula y dispersión en el hospedante, respectivamente. En el caso de los genes *GLS1* y *CHS1* para formar estructuras de infección como hifas de infección, acérvulos y conidios durante el estado necrótrofo del proceso de infección.

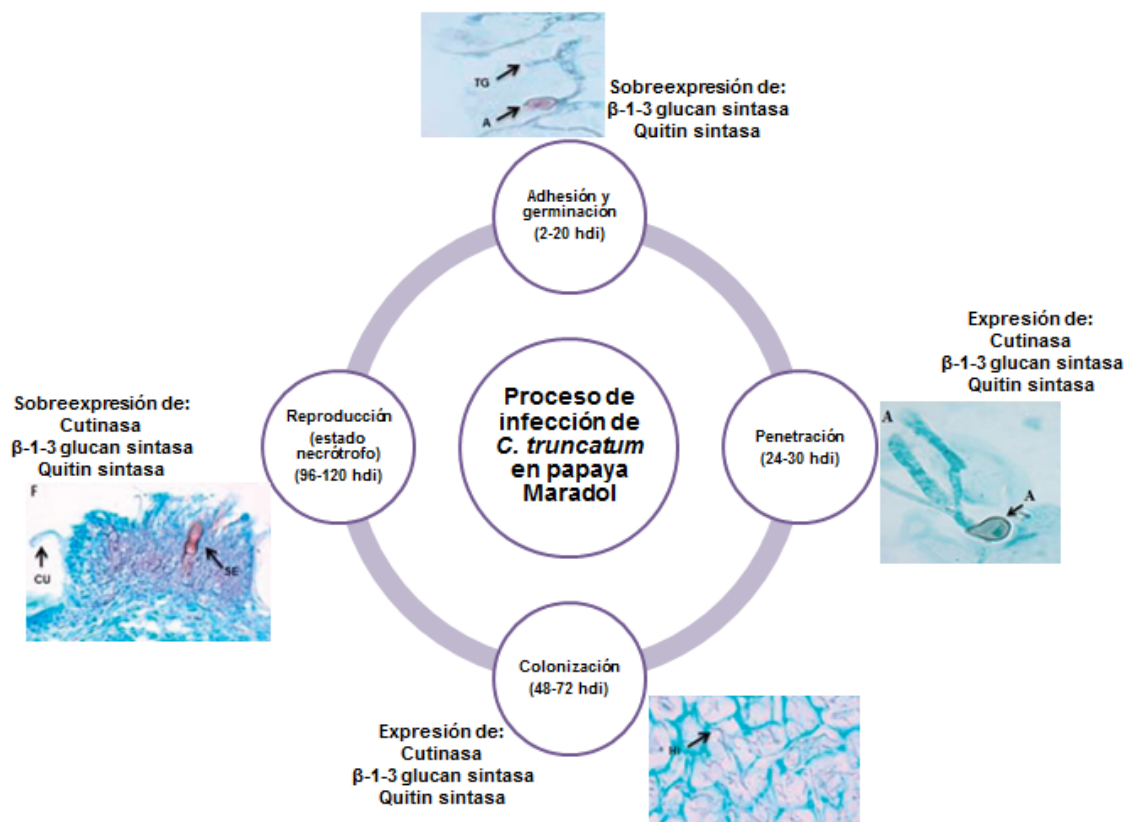


Figura 18. Proceso de infección de *C. truncatum* en fruto y hoja de papaya Maradol

Alcances y limitaciones

Los resultados de esta investigación permitieron conocer el proceso de infección de *C. truncatum* en papaya; mediante técnicas histológicas se estableció la estrategia de infección que emplea *C. truncatum*; sin embargo, una limitante del estudio fue que solo se empleó microscopía óptica, con la cual no se logró una alta resolución en la observación de las estructuras de infección del patógeno. Por otra parte, en esta investigación se determinó el nivel de expresión génica de tres genes relacionados a patogenicidad; sin embargo, una limitante del estudio fue que no se efectuó la transformación de vectores, ni silenciamiento génico que demuestre contundentemente la participación de los genes en estudio en el proceso de infección de *C. truncatum* en papaya.

Perspectivas futuras

C. truncatum utiliza la estrategia de colonización intramural subcuticular en papaya, ya que se observaron las etapas de penetración, colonización, infección y reproducción del patógeno; además, se determinó la expresión de algunos genes relacionados a patogenicidad; sin embargo, se requieren estudios adicionales, principalmente moleculares, que faciliten el entendimiento de este proceso de infección, que determinen la expresión de otros genes importantes que se expresan durante el estado necrótrofo, que diluciden el genoma de *C. truncatum* para obtener un panorama amplio de su patogenicidad; así como que analice la expresión *in planta* de los genes de defensa de papaya, con lo cual se podrían sentar las bases para establecer futuras estrategias de control del patógeno en este y otros hospedantes.