



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA,
MOLECULAR, PATOGÉNICA Y SENSIBILIDAD
A FUNGICIDAS DE AISLADOS DE *Colletotrichum*
spp. CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL
MANGO EN MÉXICO**

JUAN MANUEL TOVAR PEDRAZA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2014

La presente tesis, titulada: **Caracterización fenotípica, molecular, patogénica y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del mango en México**, realizada por el alumno: **Juan Manuel Tovar Pedraza**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:  _____

DR. JOSÉ ANTONIO MORA AGUILERA

ASESOR:  _____

DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

ASESOR:  _____

DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:  _____

DR. JOSÉ SERGIO SANDOVAL ISLAS

ASESOR:  _____

DR. ÁNGEL REBOLLAR ALVITER

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre 2014

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento durante mi programa de estudios doctorales.

A la SAGARPA-CONACYT por el financiamiento parcial otorgado a través del proyecto 48595.

Al Colegio de Postgraduados por el financiamiento para tesis mediante el fideicomiso 167304.

Al COMECYT por el apoyo complementario para tesis de postgrado.

Al Dr. José Antonio Mora Aguilera por la invaluable dirección en la planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por el apoyo en diversas etapas de mi vida profesional.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dr. Cristian Nava Díaz, Dr. José Sergio Sandoval Islas y Dr. Ángel Rebollar Alviter, con todo mi respeto y agradecimiento por sus acertadas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

Al M.C. Jorge Alvarado López por la revisión de sintaxis y estilo de este documento.

Al M.C. Dagoberto Fierro Corrales, Dr. Alfonso Vásquez López y Dr. Rafael Gómez Jaimes por su asistencia técnica durante los muestreos realizados en huertos de mango.

A la Ing. Eréndira Guadalupe Ríos López, Ing. Mónica Peredo Arellano y al Ing. Martín Yáñez Zúñiga por su asistencia técnica en laboratorio durante las pruebas de sensibilidad a fungicidas.

A la Biol. Teresa Berenice Uribe Cortes y a la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por su asesoría técnica en la extracción, amplificación y secuenciación de ADN.

Al Dr. Jorge Sami Michereff y Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara por las facilidades brindadas durante mi estancia en Brasil, así como su asesoría en el análisis de secuencias.

A la M.C. Victoria Ayala Escobar por su amistad, apoyo y excelente disposición para colaborar en diversas investigaciones.

A Elvia Rosas por su amistad y facilidades brindadas en la fase administrativa y de laboratorio.

A Hilda, Michelle, Verónica y Silvia por su amable atención y apoyo en los diversos trámites realizados en el postgrado de Fitosanidad.

A mis amigos y compañeros del postgrado en Fitopatología: Alma, Gildardo, Jaime, Silvia, Dagoberto, Elvis, Berenice, Guadalupe, Elizabeth, Daniel, Ramón, Japhet, Alba, Liliana, Edgar, Jorge, Santiago, Moisés, Luis Alfonso, Lauro, Maricarmen, Leticia, Celeste y Gregg por el apoyo brindado en los momentos en los que los requerí.

DEDICATORIA

A: Leonarda Pedraza Portuguez

y

Cindy Denise Lara Pedraza

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivos.....	5
Revision de literatura.....	6
Literatura citada.....	22
CAPÍTULO I. DIVERSIDAD DE ESPECIES DE <i>Colletotrichum</i> CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL MANGO EN MÉXICO	
Resumen.....	36
Abstract.....	37
Introducción.....	38
Materiales y Métodos.....	40
Resultados y Discusión.....	50
Conclusiones.....	61
Literatura citada.....	62
CAPÍTULO II. SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS MBC Y SENSIBILIDAD BASE A PROCLORAZ EN ESPECIES DEL COMPLEJO <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL MANGO EN MÉXICO	
Resumen.....	68
Abstract.....	69
Introducción.....	70
Materiales y Métodos.....	72
Resultados y Discusión.....	76
Conclusiones.....	83
Literatura citada.....	84

CAPÍTULO III. RESISTENCIA A FUNGICIDAS QoI EN AISLADOS DEL COMPLEJO *Colletotrichum gloeosporioides* CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL MANGO EN MÉXICO

Resumen.....	91
Abstract.....	92
Introducción.....	93
Materiales y Métodos.....	95
Resultados y Discusión.....	99
Conclusiones.....	106
Literatura citada.....	106
CONCLUSIONES GENERALES.....	113
RECOMENDACIONES GENERALES.....	115

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CAPÍTULO I	
Cuadro 1. Sitios y fecha de colecta, cultivar y tejido de mango de los aislados de <i>Colletotrichum</i> incluidos en este estudio para caracterización fenotípica, patogénica y análisis de secuencia <i>Apn2</i> /MAT IGS.....	43
Cuadro 2. Características morfológicas y culturales de 100 aislados de <i>Colletotrichum</i> obtenidos de tejidos de mango con síntomas de antracnosis en huertos comerciales, de México.....	50
CAPÍTULO II	
Cuadro 1. Origen geográfico, año de colecta y número de aislados del complejo <i>C. gloeosporioides</i> obtenidos de mango, para determinar la sensibilidad <i>in vitro</i> a benomil, carbendazim y procloraz.....	73
CAPÍTULO III	
Cuadro 1. Origen, año de colecta y numero de aislados del complejo <i>C. gloeosporioides</i> usados en ensayos de sensibilidad <i>in vitro</i> a fungicidas QoI.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1. Síntomas y signos de las principales enfermedades fúngicas del mango (*Mangifera indica* L.) en México. (A-C) Antracnosis (*Colletotrichum* spp.). (D-E) Cenicilla (*Pseudoidium anacardii*). (F-G) Malformación o escoba de bruja (*Fusarium* spp.). (H-I) Muerte descendente y pudrición de pedúnculo (especies de Botryosphaeriaceae)..... **11**

CAPÍTULO I

Figura 1. Síntomas y signos causados por *Colletotrichum* spp. en tejidos de mango cvs. Tommy Atkins (A), Ataulfo (B-F, H), Manila (I y J) y Haden (K y L). (A) Hoja con lesiones necróticas irregulares con halo amarillento. (B-C) Hojas con atizonamiento; (D) Acérvulos desarrollados sobre lesión foliar. (E) Tizón en flores. (F) Ramita con lesiones necróticas; (G) Ramita con muerte descendente. (H-L) Frutos con lesiones necróticas irregulares y hundidas..... **41**

Figura 2. Localización en México de huertos comerciales de mango a partir de los cuales se recolectaron tejidos de mango con síntomas de antracnosis para la obtención de aislados de *Colletotrichum* spp. usados en este estudio. n = número de aislados obtenidos de cada estado..... **42**

Figura 3. Colonias de *Colletotrichum* con 6 días de crecimiento en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), aisladas de tejidos de mango con síntomas de antracnosis..... **53**

Figura 4. Colonias de *Colletotrichum* con 6 días de crecimiento en medio de cultivo extracto de malta agar (MEA), aisladas de tejidos de mango con síntomas de antracnosis..... **53**

Figura 5. Conidios de *Colletotrichum* formados en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) después de 10 días de incubación a 28 °C y en oscuridad continua. (A-E) Microscopía de contraste de fases, (F-I) Microscopía de luz de campo brillante. Barras = 10 µm..... **54**

Figura 6. Árbol filogenético reflejo de la inferencia bayesiana de 65 aislados de *Colletotrichum* usando datos de secuencias *Apn2*/MAT IGS. El árbol muestra las relaciones filogenéticas de las especies de *Colletotrichum* aisladas de tejidos de mango (*Mangifera indica* L.) y de las especies seleccionadas del “clado Musae”. Los valores bayesianos de probabilidad posterior ≥ 0.5 se muestran en cada nodo. Las secuencias ex epitipo están enfatizadas en negritas. Los números de acceso, hospedante y origen geográfico de los cultivos están enlistados. La secuencia de *C. horii* se utilizó como grupo distinto. La barra indica el número de cambios esperados por sitio.....

57

Figura 7. Lesiones necróticas y hundidas típicas de antracnosis en frutos de mango cv. Manila, resultado de la prueba de patogenicidad de diferentes aislados de *Colletotrichum* spp. a 6 días después de la inoculación artificial con una suspensión de conidios.....

59

CAPÍTULO II

Figura 1. Distribución de frecuencia de valores de concentración efectiva de benomil a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 100 aislados de especies del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos en huertos comerciales de mango, en México.....

76

Figura 2. Valores de concentración efectiva para fungicidas MBC (benomil y carbendazim) a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 25 aislados de especies del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos en huertos comerciales de mango, en México.....

78

Figura 3. Distribución de frecuencia de valores de concentración efectiva de procloraz a la cual se inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) de 100 aislados de especies del complejo *C. gloeosporioides* nunca expuestos a aplicaciones de fungicidas DMI en huertos comerciales de mango, en México.....

80

Figura 4. Efecto del fungicida procloraz sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos de huertos comerciales de mango, en México, sin historial de aplicaciones de fungicidas MDI. (A) Aislado colectado en un huerto del estado de Nayarit. (B) Aislado proveniente de un huerto del estado de Oaxaca.....

81

CAPÍTULO III

Figura 1. Valores de concentración efectiva de azoxystrobin a cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 16 aislados del complejo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de la subpoblación con sensibilidad base, los cuales se colectaron en huertos comerciales de mango, en México, sin historial de aplicaciones de fungicidas QoI.....	99
Figura 2. Efecto de siete concentraciones del fungicida azoxystrobin sobre el crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislados del complejo <i>C. gloeosporioides</i> obtenidos de huertos de mango, en México. (A) Aislado con sensibilidad base (sb). (B) Aislado resistente (r). (C-D) Aislados altamente resistentes (ar).....	101
Figura 3. Distribución de frecuencia de valores de concentración efectiva de azoxystrobin a cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 84 aislados del complejo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de la subpoblación colectada en huertos comerciales de mango con historial de aplicaciones de fungicidas QoI.....	102
Figura 4. Localización geográfica de aislados del complejo <i>C. gloeosporioides</i> evaluados en una prueba de inhibición del crecimiento micelial con el fungicida azoxystrobin. El número total de los aislados evaluados de cada estado se encuentra indicado en la tabla. El porcentaje de frecuencia de aislados sensibles (gris) y resistentes (negro) se encuentra representado en los círculos.....	103
Figura 5. Valores de concentración efectiva de azoxystrobin y kresoxim-metil a cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para ocho aislados del complejo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> de la subpoblación con sensibilidad base, los cuales se colectaron en huertos comerciales de mango, en México, sin historial de aplicaciones de fungicidas QoI.....	104

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, MOLECULAR, PATOGENICA Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE AISLADOS DE *Colletotrichum* spp. CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL MANGO EN MÉXICO

Juan Manuel Tovar Pedraza, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad pre- y postcosecha más importante del mango a nivel mundial y es controlada principalmente mediante el uso de fungicidas pertenecientes a las clases metil-benzimidazol-carbamatos (MBC), inhibidores externos de la quinona (QoI) e inhibidores de la demetilación (DMI). En México, esta enfermedad se ha asociado únicamente a *C. gloeosporioides* y *C. asianum*. En este estudio, se utilizó caracterización fenotípica, patogénica y análisis de secuencias *Apn2*/MAT IGS para identificar a las especies de *Colletotrichum* responsables de causar la antracnosis del mango en México. Adicionalmente, se determinó la sensibilidad *in vitro* a fungicidas MBC (benomil y carbendazim), QoI (azoxystrobin y kresoxim-metil) y se estimó la sensibilidad base al procloraz (DMI), en 100 aislados *Colletotrichum* colectados de 2010 a 2013 en huertos comerciales de mango distribuidos en los principales estados productores de México. La caracterización morfológica y cultural indicó que todos los aislados pertenecieron al complejo de especies de *Colletotrichum gloeosporioides*. El análisis filogenético reveló que *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola* son las especies asociadas a esta enfermedad. Así mismo, las pruebas de patogenicidad en frutos de mango mostraron que todos los aislados indujeron la enfermedad. Los aislados presentaron valores de concentración efectiva a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) que variaron de 0.1123 a 0.3543, de 0.0880 a 0.1792, de 0.0016 a >1000, de 0.0335 a >1000 y de 0.0048 a 0.0851 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para benomil, carbendazim, azoxystrobin, kresoxim-metil y procloraz, respectivamente. Estos resultados mostraron alta sensibilidad a fungicidas MBC y DMI en especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del mango en México. Sin embargo, se detectó la existencia de aislados altamente resistentes a fungicidas QoI en huertos de mango de México. Los datos determinados en este estudio permitirán monitorear variaciones posteriores en la sensibilidad de poblaciones de *Colletotrichum* de mango a fungicidas MBC, QoI y DMI.

Palabras clave: *Mangifera indica*, *Colletotrichum*, *Apn2*/Mat IGS, fungicidas, resistencia.

**PHENOTYPIC, MOLECULAR, AND PATHOGENIC CHARACTERIZATION AND
FUNGICIDE SENSITIVITY OF *Colletotrichum* SPECIES CAUSING MANGO
ANTHRACNOSE IN MEXICO**

Juan Manuel Tovar Pedraza, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

Anthracnose, caused by *Colletotrichum* spp., is the most important pre- and postharvest disease of mango worldwide and is controlled primarily by fungicides belonging to Methyl Benzimidazole Carbamates (MBC), Quinone outside inhibitors (QoI) and Demethylation inhibitors (DMI) classes. In Mexico, only *C. gloeosporioides* and *C. asianum* have previously been associated to this disease. In this study, phenotypic and pathogenic characterizations as well as *Apn2*/MAT IGS sequence-data were used to identify the *Colletotrichum* species causing mango anthracnose in Mexico. During the years 2010-2013, a total of 100 *Colletotrichum* isolates were obtained from mango tissues with anthracnose symptoms across the major mango production areas in Mexico. All isolates were screened for sensitivity to MBC (benomyl and carbendazim) and QoI (azoxystrobin and kresoxim-methyl) fungicides and tested to determine their baseline sensitivity to prochloraz. Isolates were tested using an *in vitro* assay to determine the effective fungicide concentration at which 50% of mycelial growth was inhibited (EC_{50}) for each isolate-fungicide combination. Based on morphological and cultural characteristics, all isolates were identified in the *C. gloeosporioides* species complex. While, the phylogenetic analysis generated from *Apn2*/MAT IGS sequences revealed that *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* and *C. fructicola* were associated with symptoms of mango anthracnose. Pathogenicity tests on mango fruits showed that all isolates from this study could induce anthracnose lesions. EC_{50} values ranged from 0.1123 to 0.3543, 0.0880 to 0.1792, 0.0016 to >1000, 0.0335 to >1000 and from 0.0048 to 0.0851 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for benomyl, carbendazim, azoxystrobin, kresoxim-methyl and prochloraz, respectively. Our results revealed the existence in Mexico of species of *Colletotrichum* from mango that are highly sensitive to benomyl, carbendazim and prochloraz. Also, we determined the presence of resistance to QoI fungicides in species of *Colletotrichum* from mango in Mexico. The data obtained here will serve to monitor future variations in sensitivities of *Colletotrichum* populations from mango to MBC, QoI and DMI fungicides.

Keywords: *Mangifera indica*, *Colletotrichum*, *Apn2*/Mat IGS, fungicides, resistance.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los cinco cultivos económicamente más importantes a nivel mundial, y se produce en países del trópico y subtrópico (Mukherjee y Litz, 2009; Paull y Duarte, 2011). Durante el periodo 2000-2010, México se colocó como el cuarto mayor productor y el principal exportador de mangos en el mundo (FAOSTAT, 2010). En México, la producción de mango se distribuye en 23 estados, sin embargo, más de 97% de la producción se concentra en 10 estados (Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz) (SIAP, 2013).

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad más importante del mango en casi todas las áreas de producción de este frutal, debido a que esta ocasiona daños en hojas, ramas, panículas y frutos (Arauz, 2000; Ploetz, 2003; Ploetz y Freeman, 2009; Paull y Duarte, 2011). Cuando la inflorescencia se infecta, la producción se reduce de manera drástica. La enfermedad se encuentra como infección quiescente en frutos inmaduros y desde el punto de vista económico, el daño que induce es significativo en la etapa de postcosecha (Prusky *et al.*, 2009). Así mismo, la incidencia de la enfermedad puede llegar casi a 100% en frutos producidos en áreas con alta humedad durante el periodo de floración, en particular en huertos de mango con manejo deficiente (Arauz, 2000; Ploetz y Freeman, 2009).

Los síntomas de antracnosis en huertos de mango se pueden observar en hojas, ramas, panículas y frutos. En hojas, las lesiones son irregulares, necróticas, frecuentemente rodeadas por halos cloróticos y no delimitadas por las nervaduras. Las lesiones pueden coalescer y formar largas áreas necróticas, especialmente a lo largo de los márgenes. Bajo condiciones favorables se pueden formar sobre las lesiones cuerpos fructíferos (acérvulos) del patógeno de color salmón a naranja. En ramas, los síntomas comienzan a manera de lesiones necróticas pequeñas oval-

alargadas que se expanden y coalescen con el avance del tiempo. En infecciones severas, el hongo puede invadir ramas y causar muerte descendente. En panículas, las flores presentan pequeños puntos negros que se amplían gradualmente y se unen hasta causar tizón de flores. Los frutos pueden ser afectados en cualquier estado de su desarrollo. En tanto, la infección severa de frutos jóvenes se presenta a manera de momificación. Mientras que las infecciones en frutos más grandes permanecen latentes hasta que los frutos maduran, y la enfermedad se observa con la aparición de lesiones negras, irregulares y hundidas en la superficie de los frutos (Arauz, 2000; Ploetz, 2003; Prakash, 2004; Prusky *et al.*, 2009; Ploetz y Freeman, 2009).

La identificación apropiada de la especie del fitopatógeno es crítica para entender la epidemiología y el desarrollo de medidas efectivas de control de estas enfermedades (Cai *et al.*, 2009). La circunscripción e identificación de especies de *Colletotrichum* se había basado históricamente en el rango de hospedantes, síntomas de la infección sobre hospedantes particulares, además de un conjunto de caracteres morfológicos (Hyde *et al.*, 2009 a, b). Sin embargo, el uso de caracteres taxonómicos convencionales en *Colletotrichum* ha sido problemático y ha fallado para identificar a las diversas especies crípticas que presenta este género de hongo fitopatógeno, por lo que las herramientas moleculares se han empleado para inferir las relaciones evolutivas de las especies de *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2009 a, b; Phoulivong *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2012 a, b; Cannon *et al.*, 2012).

De acuerdo con algunos estudios previos, la taxonomía de especies de *Colletotrichum* asociadas a tejidos de mango se había clarificado por la adopción de análisis filogenéticos multi-locus en conjunto con caracterización fenotípica. De esta manera se reportó a diferentes especies crípticas, pertenecientes a los complejos *gloeosporioides* (*C. asianum*, *C. gloeosporioides*, *C. tropicale*, *C. fructicola*, *C. dianesei*, *C. siamense*, *C. endomangiferae*) (Phoulivong *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013; Honger *et al.*, 2014; Udayanga *et al.*, 2013; James *et al.*,

2014) *acutatum* (*C. fioriniae* y *C. simmondsii*) (Damm *et al.*, 2012b) y *boninense* (*C. karstii*) (Damm *et al.*, 2012a; Lima *et al.*, 2013). Así mismo, en estudios realizados por Sharma *et al.* (2013), Vieira *et al.* (2014) y Sharma *et al.* (2014), con aislados de *Colletotrichum* obtenidos de tejidos de mango, se concluyó que los datos de la secuencia del locus *Apn2/MAT* IGS proporcionan una mejor resolución filogenética de la diversidad de clados terminales, comparada con los seis genes concatenados (*ACT*, *TUB2*, *CAL*, *CHS*, *GAPDH*, *ITS*) para identificar especies pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides*.

En el caso de México, la antracnosis del mango se había atribuido exclusivamente a *C. gloeosporioides* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003; Rojas-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, en un estudio reciente realizado por Honger *et al.* (2014), se determinó, mediante análisis filogenético multilocus, que *C. asianum* se encuentra asociado a la antracnosis del mango en este país.

Entre las herramientas básicas para el manejo de la antracnosis del mango en condiciones de campo se encuentran los fungicidas sistémicos pertenecientes a las clases metil-benzimidazol-carbamatos (MBC) e inhibidores externos de la quinona (QoI), así como fungicidas de contacto de la clase de los ditiocarbamatos y derivados de cobre (McMillan, 1984; Ploetz, 2003; Akem, 2006; Prusky *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2012; Diedhiou *et al.*, 2014).

Los fungicidas sistémicos pertenecientes a la clase MBC están representados principalmente por benomil, carbendazim, tiabendazol y tiofanato-metil. El modo de acción de estos se basa en inhibir la producción de microtúbulos, mediante su unión a las subunidades heterodiméricas de la molécula tubulina (Peres *et al.*, 2004). La resistencia a fungicidas MBC se asocia a cambios en la secuencia de aminoácidos ocasionados por mutaciones en los codones 6, 50, 167, 198, 200 y 240 del gen *B-tubulina* (Ma y Michailides, 2005). Existen diversos reportes de hongos fitopatógenos que los han señalado como resistentes a fungicidas MBC. En el caso de aislados de *Colletotrichum* spp. de mango, el control de la antracnosis ha sido irregular en

algunos huertos comerciales, en donde continuamente se han aplicado fungicidas MBC, esto debido a la expresión de resistencia por parte del patógeno, como se reportó en EE.UU. (Spalding, 1982), Tailandia (Farungsang y Farungsang, 1992; Nalumpang *et al.*, 2010; Kongtragoul *et al.*, 2011), Sudáfrica (Sanders *et al.*, 2000), India (Kumar *et al.*, 2007) y China (Xu *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013).

El procloraz es un fungicida DMI-imidazol, sistémico local con actividad erradicante y su modo de acción se basa en la inhibición de la ruta de la biosíntesis del ergosterol (Ma y Michailides, 2005). Este fungicida se ha usado como un protectante o erradicante (Estrada *et al.*, 1996), además de utilizarse en combinación con agua caliente como un tratamiento postcosecha, en frutos de mango con destino final a países de la Unión Europea (Arauz, 2000; Oosthuysen, 2000; Dang *et al.*, 2008; Prusky *et al.*, 2009; Swart *et al.*, 2009). Según Arauz (2000), la efectividad de este fungicida bajo condiciones de campo puede variar de 65 a 94%, con una alta y moderada presión de la enfermedad, respectivamente. En Taiwán, la frecuencia de aplicaciones de procloraz por ciclo varía de 1 a 16, dependiendo de la incidencia de la enfermedad (Kuo, 2001). En contraste, en México, los fungicidas DMI prácticamente no se usan para el control de esta enfermedad en campo.

Actualmente, la resistencia a fungicidas QoI se ha reportado en al menos tres géneros de oomicetes y 27 géneros de hongos (FRAC, 2012), incluyendo especies de *Colletotrichum* como *C. cereale*, en pastos de golf, en Japón (Avila-Adame *et al.*, 2003) y EE.UU. (Wong *et al.*, 2007; Mitkowski *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2010), además de *C. gloeosporioides* en fresa en Japón (Inada *et al.*, 2008). En el caso de aislados de *C. gloeosporioides* de mango, se ha reportado la presencia de aislados resistentes a fungicidas QoI en huertos comerciales de China (Zhang *et al.*, 2013).

Objetivos generales

- 1) Determinar la diversidad de especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del mango en México, mediante caracterización fenotípica, pruebas de patogenicidad y análisis de secuencias *Apn2*/MAT IGS.
- 2) Estimar la sensibilidad a los fungicidas benomil, carbendazim, azoxystrobin y kresoxim-metil, en poblaciones de *Colletotrichum* spp. obtenidas de mango, así como establecer los valores de línea base de la sensibilidad al fungicida procloraz.

Objetivos específicos

- 1) Identificar las especies de *Colletotrichum* asociadas a tejidos de mango con síntomas de antracnosis, mediante la combinación de caracterización morfológica, cultural y análisis de secuencias *Apn2*/MAT IGS.
- 2) Determinar las especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del mango en México, mediante la realización de pruebas de patogenicidad en frutos.
- 3) Estimar los valores de sensibilidad a benomil y carbendazim en aislados de *Colletotrichum* spp. con historial de aplicaciones en campo de estos fungicidas.
- 4) Establecer los valores de línea base de la sensibilidad al fungicida procloraz en aislados de *Colletotrichum* spp. que no se han expuesto a este fungicida o cualquier otro fungicida perteneciente a la clase de los inhibidores de la demetilación.
- 5) Determinar la distribución de la sensibilidad base a azoxystrobin y kresoxim-metil, mediante prueba de inhibición del crecimiento micelial, en poblaciones de campo de aislados de *Colletotrichum* spp. de mango y determinar si se presenta resistencia a azoxystrobin y kresoxim-metil, en aislados de campo del complejo *C. gloeosporioides* de huertos de mango en México.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen y distribución del mango (*Mangifera indica* L.)

El mango (*Mangifera indica* L.) es originario de la India y Asia Sudoriental, donde este frutal se ha cultivado por más de 4000 años. Probablemente, los comerciantes indios y sacerdotes budistas introdujeron el mango a Malasia y otros países de Asia oriental, durante el cuarto o quinto siglo A. C., y a Filipinas, entre 1400 y 1450 D.C. Los portugueses fueron los primeros europeos en establecer rutas comerciales con la India y transportaron el mango hacia el este de África (Mozambique y Angola) y Brasil. Mientras que comerciantes españoles tomaron el mango de Filipinas y lo llevaron a la costa oeste de México, antes de que los ingleses llegaran a las islas de Hawái, en 1778. Por lo que este frutal fue introducido a Hawái proveniente de la costa oeste de México, entre 1800 y 1820, por el horticultor español Don Francisco de Paula Marín. Aparentemente, los mangos que se introdujeron a Brasil se extendieron a Barbados y otras islas de la zona del Caribe (Mukherjee y Litz, 2009; Paull y Duarte, 2011). En la actualidad, el mango se cultiva en todas las zonas tropicales, así como muchas regiones subtropicales del mundo, lo que demuestra su amplia adaptabilidad a un diverso rango de suelos, climas y altitudes, y desempeña un papel vital en la dieta de millones de personas en las regiones tropicales de África, América y Asia, en donde el consumo local es elevado (Prakash, 2004; Mukherjee y Litz, 2009; Paull y Duarte, 2011).

Importancia del mango

El cultivo del mango ocupa el quinto lugar en el mundo después la banana, vid, manzana y naranja, entre los frutales más importantes en cuanto a la producción total (FAOSTAT, 2010).

En México, la producción de mango se distribuye en 23 estados, sin embargo, más de 97% de la producción se concentra en solo 10 (Guerrero, Nayarit, Chiapas, Oaxaca, Sinaloa, Michoacán, Veracruz, Jalisco, Colima y Campeche) (SIAP, 2013). Es importante señalar que entre 2002 y 2008 la superficie total de mango en México se incrementó en 106%, pero en los principales cultivares fue de 246, 565, 159, 283, 110 y 345% para ‘Ataulfo’, ‘Haden’, ‘Keitt’, ‘Kent’, ‘Manila’ y ‘Tommy Atkins’, respectivamente. Lo anterior, consideró un rendimiento promedio nacional de 10 t ha⁻¹, dado que la demanda se ha atendido aumentando la superficie cultivada y no el rendimiento (Villegas-Monter y Mora-Aguilera, 2011).

Países productores y exportadores de mango

En 2010, los mayores productores de mango fueron la India, China, Tailandia, Pakistán y México, con 16.3, 4.3, 2.5, 1.7, y 1.6 millones de toneladas, respectivamente. Mientras que los principales países exportadores, en orden de importancia, fueron México, India y Brasil. En el caso de México, este exportó casi 20% de su producción (270000 t) principalmente a EE. UU. (FAOSTAT, 2010).

Enfermedades del mango

El mango es afectado por varias enfermedades, durante todas las etapas de su desarrollo, desde la planta en vivero hasta el almacenamiento de la fruta o transporte. Las enfermedades en campo tienen como resultado la pérdida de la cosecha, mientras que las enfermedades en postcosecha están ligadas con pérdidas en la exportación y en mercado interno. Cualquier órgano de la planta es susceptible a ser infectado; tallos, ramas, raíces, hojas, flores y frutas son afectados por varias enfermedades que se manifiestan con síntomas de pudrición, muerte descendente, tizón, necrosis, roña, cenicilla, mancha foliar, marchitez, canchales, fumagina, malformaciones y desórdenes de etiología desconocida. Algunas de estas enfermedades han llegado a ser el principal factor limitante en la producción del cultivo del mango (Prakash, 2004). Aunque la mayor parte de estas enfermedades son causadas por hongos, también existen otros patógenos importantes, como son algas y bacterias. Sin embargo, no se conoce ninguna enfermedad del mango causada por fitoplasma, protozoarios, viroide o virus (Ploetz, 2003).

Enfermedades del mango causadas por bacterias

Las enfermedades causadas por bacterias que se ha reportado que inducen daños importantes en el cultivo del mango son: necrosis apical o mancha negra bacteriana (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) (Gagnevin y Pruvost, 2001), cancro bacteriano (*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Ah-You *et al.*, 2007), pudrición bacteriana del fruto y tronco (*Erwinia mangiferae* y *Erwinia carotovora*) (Steyn *et al.*, 1974).

Enfermedades del mango causadas por nematodos

El declinamiento de árboles de mango debido a nematodos se ha reportado en varias regiones del mundo (Anita y Chaubey, 2003). Las infestaciones ocurren en áreas con temperaturas cálidas y donde predominan los suelos húmedos y arenosos. Las principales especies de nematodos que se han asociado a muestras de suelo y raíces de mango son: *Helicotylenchus dihystera*, *Quinisulcius acutus*, *Rotylenchulus reniformis*, *Rotylenchulus macrodoratus*, *Criconemella sphaerocephala*, *Pratylenchus brachyurus*, *Xiphinema americanum*, *Xiphinema brevicolle*, *Macroposthonia xenoplax*, *Meloidogyne incognita* y *Hoplolaimus pararobustus*. Sin embargo, solo *Hemicriconemoides mangiferae* se ha reportado como patógeno serio (Ploetz *et al.*, 1994). Por otra parte, altas poblaciones de *R. reniformis* se han encontrado en muestras de mango, pero ninguna correlación se ha mostrado entre su densidad y la salud del árbol (Ploetz, 2003).

Enfermedades del mango causadas por algas y líquenes

La “roya roja” causada por una alga parasítica (*Cephaleuros virescens*) (sin. *C. parasiticus*, *C. mycoidea*) se ha reportado en Sri Lanka, EE.UU. (Florida), Bangladesh, Sudáfrica y Brasil (Lim y Khoo, 1985). Además, se han encontrado líquenes en árboles grandes, en tronco, ramas y ramitas, en áreas donde prevalece una elevada humedad, riegos pesados y huertos con manejo agronómico deficiente. Estos organismos no causan un daño directo al árbol, pero dan una mala apariencia (Ploetz, 2003).

Enfermedades del mango causadas por hongos y oomicetes

Existen varias enfermedades en mango inducidas por hongos y oomicetes que se ha reportado que causan síntomas severos y reducción en la calidad y cantidad de la producción en condiciones de pre y postcosecha (Ploetz, 2003). Algunas de las enfermedades más comunes en precosecha son: antracnosis (*Colletotrichum* spp.), cenicilla (*Pseudoidium anacardii*), escoba de bruja o malformación (*Fusarium* spp.), muerte descendente (especies de Botryosphaeriaceae), roña (*Denticularia mangiferae*), mancha plateada (*Pestalotiopsis mangiferae*), secadera (*Ceratocystis fimbriata*), marchitez (*Verticillium albo-atrum*), mancha negra (*Alternaria* spp.), tizón negro (*Meliola* spp.), mancha foliar oval (*Phoma* spp.) pudrición de raíz y gomosis (*Phytophthora* spp.), y marchitez de plántulas (*Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani*). Mientras que, las enfermedades más importantes del mango en condiciones de postcosecha son: antracnosis (*Colletotrichum* spp.), pudrición del pedúnculo (especies de la familia Botryosphaeriaceae) y pudrición del fruto (*Alternaria* spp.) (Ploetz *et al.*, 1994; Ploetz, 2003, Prakash, 2004; Prusky *et al.*, 2009; Ploetz y Freeman, 2009).

Las principales enfermedades que afectan la producción del cultivo de mango en México son escoba de bruja, antracnosis, cenicilla y muerte descendente (Figura 1). Los daños que estas enfermedades originan dependen de las condiciones climáticas presentes en cada ciclo del cultivo; si estas son adecuadas para los patógenos, las enfermedades pueden ser muy destructivas (Mora-Aguilera *et al.*, 1998).

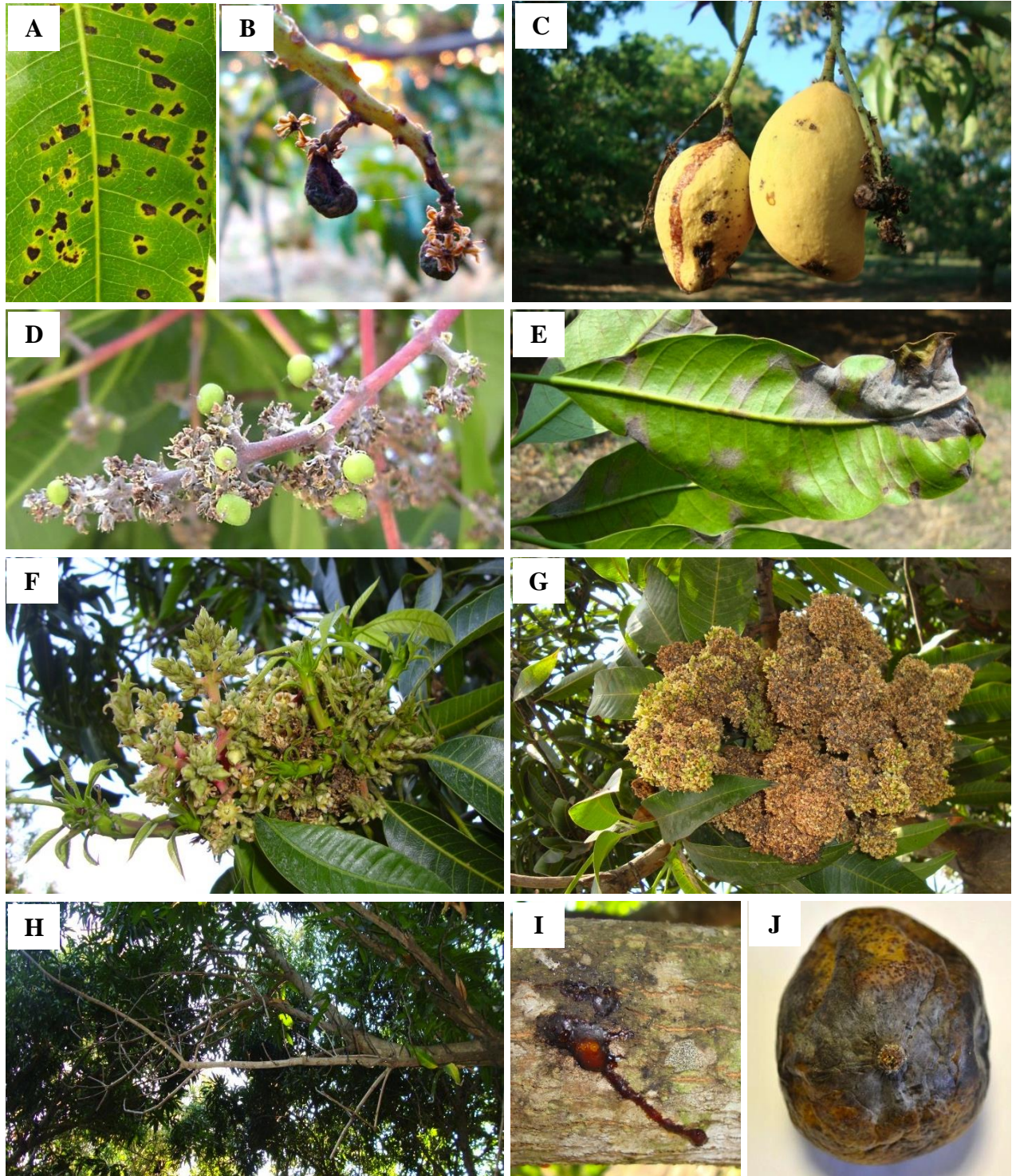


Figura 1. Síntomas y signos de las principales enfermedades fúngicas del mango (*Mangifera indica* L.) en México. (A-C) Antracnosis (*Colletotrichum* spp.). (D-E) Cenicilla (*Pseudoidium anacardii*). (F-G) Malformación o escoba de bruja (*Fusarium* spp.). (H-J) Muerte descendente y pudrición de pedúnculo (especies de Botryosphaeriaceae).

Importancia y distribución de la antracnosis

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp. es la enfermedad más importante del mango, en casi todas las áreas de producción de este frutal, debido a que esta enfermedad ocasiona daños en hojas, ramitas, panículas y frutos (Arauz, 2000; Ploetz, 2003; Ploetz y Freeman, 2009; Paull y Duarte, 2011). En los casos en las que la inflorescencia es infectada, la producción se reduce drásticamente. La enfermedad se encuentra como infección quiescente en frutos inmaduros y el daño que induce es significativo económicamente, en la etapa de postcosecha (Prusky *et al.*, 2009). Así mismo, la incidencia de la enfermedad puede llegar casi a 100% en frutos producidos en áreas con alta humedad, durante el periodo de floración, y en particular, en huertos de mango con manejo deficiente (Arauz, 2000; Prusky *et al.*, 2009; Ploetz y Freeman, 2009).

La distribución de la antracnosis del mango en el mundo es amplia y se presenta en todas las áreas donde se cultiva este frutal, aunque su importancia varía, dependiendo de cada país. En México, se encuentra distribuida en todos los estados productores de mango, causando daños severos en floración, fructificación y postcosecha; llega a ocasionar pérdidas que varían de 15 a 50% (Rojas-Martínez *et al.*, 2008).

Síntomas de la antracnosis

Los síntomas de antracnosis en huertos de mango se observan en hojas, ramas, panículas y frutos. En hojas, las lesiones son irregulares, necróticas, con frecuencias rodeadas por halos cloróticos y no delimitadas por las nervaduras. Las lesiones pueden coalescer y formar largas áreas necróticas, en especial a lo largo de los márgenes. Bajo condiciones favorables se pueden formar,

sobre las lesiones, cuerpos fructíferos (acérvulos) del patógeno de color salmón a naranja. En ramas, los síntomas comienzan a manera de lesiones necróticas pequeñas oval-alargadas, que se expanden y coalescen con el avance del tiempo. En infecciones severas, el hongo puede invadir ramas y causar muerte descendente. Lesiones pequeñas circulares, de color café oscuro a negro, se pueden desarrollar sobre panículas y pedúnculos. En panículas, las flores presentan pequeños puntos negros que se amplían gradualmente y se unen hasta causar tizón de flores. En pedicelos y pedúnculos se observan pequeñas manchas oscuras y circulares. Los frutos pueden ser afectados en cualquier estado de su desarrollo. En tanto, la infección severa de frutos jóvenes se presenta a manera de momificación, mientras que las infecciones en frutos más grandes permanecen latentes, hasta que los frutos maduran, y la enfermedad se observa con la aparición de lesiones negras, irregulares y hundidas en la superficie de los frutos (Arauz, 2000; Ploetz, 2003; Prakash, 2004; Prusky *et al.*, 2009; Ploetz y Freeman, 2009).

Agente causal de la antracnosis

La circunscripción e identificación de especies de *Colletotrichum* se había basado históricamente en el rango de hospedantes, síntomas de la infección sobre hospedantes particulares, además de un conjunto de caracteres morfológicos (Hyde *et al.*, 2009 a, b). Estudios de identificación basados solo en caracterización morfológica y cultural indicaron que las especies de *Colletotrichum* que se ha reportado que infectan a mango son: *C. gloeosporioides* (Cook, 1975; Snowdon, 1990; Ploetz, 2003), *C. gloeosporioides* var. *minor* (Simmonds, 1965), *C. acutatum* (Fitzell, 1979; Taba *et al.*, 2004) y *C. boninense* (Afanador-Kafuri *et al.*, 2003). Sin embargo, el uso de caracteres taxonómicos convencionales en *Colletotrichum* ha sido problemático y ha fallado para identificar a las diversas especies crípticas que presenta este

género de hongo fitopatógeno, por lo que las herramientas moleculares se han empleado para inferir las relaciones evolutivas de las especies de *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2009 a, b; Phoulivong *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2012 a, b; Cannon *et al.*, 2012).

De acuerdo con algunos estudios previos, la taxonomía de especies de *Colletotrichum* asociadas a tejidos de mango, se había clarificado por la adopción de análisis filogenéticos multi-locus, en conjunto con caracterización fenotípica, reportando a diferentes especies crípticas pertenecientes a los complejos *gloeosporioides* (*C. asianum*, *C. gloeosporioides*, *C. tropicale*, *C. fructicola*, *C. dianesei*, *C. siamense*, *C. endomangiferae*) (Phoulivong *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013; Honger *et al.*, 2014; Udayanga *et al.*, 2013; James *et al.*, 2014) *acutatum* (*C. fiorinae* y *C. simmondsii*) (Damm *et al.*, 2012b) y *boninense* (*C. karstii*) (Damm *et al.*, 2012a; Lima *et al.*, 2013). Así mismo, en estudios realizados por Sharma *et al.* (2013), Vieira *et al.* (2014) y Sharma *et al.* (2014), con aislados de *Colletotrichum* obtenidos de tejidos de mango, se concluyó que los datos de la secuencia del locus *Apn2/MAT* IGS proporcionan una mejor resolución filogenética de la diversidad de clados terminales comparada con los seis genes concatenados (ACT, TUB2, CAL, CHS, GAPDH, ITS) para identificar especies pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides*.

En el caso de México, la antracnosis del mango se había atribuido exclusivamente a *C. gloeosporioides* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003; Rojas-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, en un estudio reciente, realizado por Honger *et al.* (2014), se determinó mediante análisis filogenético multilocus, que *C. asianum* se encuentra asociado a la antracnosis del mango en este país.

Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad

La alta humedad relativa constituye uno de los factores primarios en la dispersión y desarrollo de la enfermedad. Los conidios producidos en ramas terminales, inflorescencias momificadas, brácteas florales y hojas son la principal fuente de inóculo (Fitzell y Peak, 1984; Dodd *et al.*, 1991; Arauz, 2000) y se producen abundantemente donde existen superficies mojadas, aunque también a humedades relativas mayores de 90%. Los conidios se dispersan a través del salpique de agua de lluvia hacia otras hojas y flores, donde estos causan infecciones secundarias (Jeffries *et al.*, 1990). En el caso de los síntomas en postcosecha, los frutos en desarrollo se infectan en campo, pero las infecciones permanecen quiescentes hasta el inicio de maduración, la cual se produce después de la cosecha (Arauz, 2000; Ploetz, 2003; Prusky *et al.*, 2009). Los apresorios se melanizan y se fortalecen, lo que facilita la infección en la cutícula a través de la hifa de penetración. La presencia y prevalencia de apresorios melanizados se ha utilizado para predecir la infección por antracnosis y cuando se necesitan medidas para su control (Fitzell y Peak, 1984; Dodd *et al.*, 1991). En general, los estados iniciales de infección (germinación de conidios y formación del apresorio) de *Colletotrichum* en frutos de mango son favorecidos por temperaturas que oscilan de 20 a 30°C y humedad relativa (HR) > 95% por 12 h (Fitzell y Peak, 1984; Dodd *et al.*, 1991). Sin embargo, los conidios pueden sobrevivir de 1-2 semanas a baja humedad relativa y después germinar, cuando estos se exponen a HR 100 % (Estrada *et al.*, 1996). Por otra parte, Fitzell y Peak (1984) indicaron que el estado sexual del hongo (*Glomerella cingulata*), aparentemente, no juega un rol en la dispersión de la enfermedad.

Uso de cultivares tolerantes para el manejo de la antracnosis

A pesar de que todos los cultivares comerciales de mango son susceptibles a la infección por *Colletotrichum* spp., algunos presentan cierto nivel de tolerancia (Campbell, 1992; Dodd *et al.*, 1997). En el caso de los principales cultivares de mango que se producen en México, Dodd *et al.* (1997) reportaron que los cultivares Keitt, Tommy Atkins y Manila son tolerantes a la enfermedad, mientras que el cv. Haden es sensible y los cultivares Ataulfo y Kent son muy sensibles. Esto debe estudiarse a profundidad, ya que el nivel de susceptibilidad de los cultivares depende de otros factores, como condiciones ambientales y presión de inóculo, los cuales varían de un lugar a otro (Ploetz, 2003; Prakash, 2004).

Control cultural de la enfermedad

Sí partimos del principio basado en que el desarrollo de la antracnosis en mango depende de una humedad relativa alta, lo ideal sería establecer huertos en áreas con estaciones secas bien definidas, con la finalidad de permitir el desarrollo del fruto en condiciones poco favorables para que se presente la enfermedad. Sin embargo, en un área establecida, los árboles de mango pueden florecer en cualquier momento durante la estación seca, dependiendo de factores como: madurez del árbol (Chacko y Ananthanarayanan, 1985), temperatura (Shu y Sheen, 1987) y estado nutricional del árbol (Reddy y Majmudar, 1985). En caso de que se produzca la floración temprana, antes de que la estación seca se establezca, flores y frutos jóvenes pueden ser infectados. Desde el punto de vista de manejo de la antracnosis, el peor escenario se produce cuando los árboles florecen a finales de la estación seca y la última parte del desarrollo del fruto se produce cuando la temporada de lluvias ya ha empezado. En este caso, la infección severa de

fruta es probable. La incidencia de antracnosis de > 90% es común en la fruta que se desarrolla durante la temporada de lluvias (Arauz *et al.*, 1994).

En áreas tropicales, una estrategia para evitar la enfermedad es el manejo de la floración, a fin de que la fruta se desarrolle durante la época menos lluviosa del año (Arauz *et al.*, 1994). La incidencia y severidad de la antracnosis del mango puede ser casi nula en la fruta desarrollada en la estación seca, sin la aplicación de alguna medida de control (Arauz, 2000). Esta estrategia no es aplicable en áreas subtropicales, donde el estímulo para la floración es la baja temperatura, más que el déficit de agua, y la floración no es seguida por períodos de sequía (Shu y Sheen, 1987). Además, en algunos países tropicales, la fruta desarrollada en la estación seca se cosecha cuando los precios del mango en los mercados internacionales son elevados. Se ha hecho un esfuerzo considerable para entender y manejar la floración del mango. Esta se puede adelantar por varias semanas, con aspersiones de nitrato de potasio (KNO₃) en el follaje maduro (Nunez-Elisea, 1985; Mora-Aguilera *et al.*, 1998). El retardador del crecimiento paclobutrazol también se puede utilizar para adelantar la floración, empleado de forma independiente (Nunez-Elisea *et al.*, 1993) o con aspersiones de KNO₃ (Miranda, 1995).

La sanidad en campo incluye la recolección e incineración de frutos caídos de árboles para el control de la antracnosis (Lim y Khoo, 1985). El saneamiento del árbol es difícil de practicar, debido a que la eliminación de panículas secas y frutos momificados es laboriosa. Además, no se ha encontrado diferencia en la severidad de antracnosis en frutos de los árboles donde las panículas secas se eliminaron, en comparación con los árboles sin eliminación de panículas, lo que indicó que el inóculo en la hoja es suficiente para dar lugar a altos niveles de enfermedad (Arauz *et al.*, 1994; Arauz, 1999).

El desarrollo de la enfermedad en frutos, empleando bolsas de papel, se ha investigado en Australia (Hofman *et al.*, 1997) y Filipinas (Bugante y Lizada, 1996). Este tipo de manejo da como resultado una reducción en la severidad de la antracnosis, pero también reduce el color rojo de la fruta, lo que puede tener un impacto negativo en el aspecto atractivo para el consumidor. Dependiendo de las condiciones del mercado y la presión de la enfermedad, esto podría superarse por el beneficio de reducción de la morbilidad (Hofman *et al.*, 1997) o la reducción en el uso de fungicidas. La rentabilidad de esta práctica dependerá del precio de mercado de la fruta (Arauz, 2000).

Control biológico de la enfermedad

Los agentes efectivos de control biológico ofrecen un gran potencial para desarrollar métodos alternativos económicos y adecuados para su adopción por la industria del mango en pequeña escala. Algunas de las bacterias que han mostrado los resultados más promisorios son: *Bacillus licheniformis* (Govender *et al.*, 2005; Govender y Korsten, 2006), *Bacillus subtilis* (Senghor *et al.*, 2007), *Brevundimonas diminuta* y *Stenotrophomonas maltophilia* (Kefialew y Ayalew, 2008). Mientras que las levaduras *Candida membranifasciens* (Kefialew y Ayalew, 2008) y *Rhodotorula minuta* (Patiño-Vera *et al.*, 2005) resultaron ser efectivas en tratamientos a frutos con antracnosis. Sin embargo, se necesitan más investigaciones sobre los mecanismos de biocontrol que ejercen estos organismos y las implicaciones a la salud humana que puede traer su aplicación en frutos de mango.

Control químico de la antracnosis

La aplicación de fungicidas en huertos de mango se enfoca básicamente a reducir el daño por antracnosis en frutos e inflorescencias, por lo que el control de la enfermedad se mejora cuando las aplicaciones se realizan antes de la floración, debido a que se elimina la fuente de inóculo presente en el follaje y en las ramas (Jeffries *et al.*, 1990). En general, el uso de fungicidas ha sido el único método de control efectivo para la antracnosis del mango y se han usado exitosamente en la mayoría de los países donde se produce este cultivo. En situaciones extremas, en las que la fruta se desarrolla en condiciones que favorecen la enfermedad, se han reportado por ciclo hasta 25 aplicaciones de fungicidas sistémicos y de contacto (Dodd *et al.*, 1997). Sin embargo, pocos fungicidas se encuentran autorizados en los países importadores para su uso en mango. Por lo tanto, la elección de los fungicidas dependerá del destino final de la fruta (Arauz, 2000; Ploetz, 2003).

Respecto a los fungicidas de contacto, los ingredientes activos de clase de los ditiocarbamatos son altamente efectivos para el control de la antracnosis, pero se utilizan en países específicos, mientras que los fungicidas a base de cobre se recomiendan ampliamente, pero su efectividad es menor (Arauz, 2000). Así mismo, se ha observado que el clorotalonil es fitotóxico cuando se aplica a los frutos que tienen un tamaño mayor de una pelota de golf (Ploetz, 2003).

Los fungicidas con actividad sistémica para el control de la antracnosis del mango incluyen a ingredientes activos pertenecientes a la clase metil-benzimidazol-carbamatos (MBC), como son: benomil, carbendazim (Jadeja y Vaishnav, 1984; Kumar *et al.*, 2007; Zhan y Huang, 2007; Ray *et al.*, 2009; Nalumpang *et al.*, 2010; Kongtragoul *et al.*, 2011; Hasan *et al.*, 2014), tiofanato-

metil y tiabendazol. Estos fungicidas representan una propuesta atractiva, en especial para prevenir la infección en las flores. En el caso de aislados de *Colletotrichum* spp. de mango, el control de la antracnosis ha sido irregular en algunos huertos comerciales en donde se han aplicado continuamente fungicidas MBC, debido a la expresión de resistencia por parte del patógeno, como se reportó en EE.UU. (Spalding, 1982), Tailandia (Farungsang y Farungsang, 1992; Nalumpang *et al.*, 2010; Kongtragoul *et al.*, 2011), Sudáfrica (Sanders *et al.*, 2000), India (Kumar *et al.*, 2007) y China (Xu *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013).

El procloraz es un fungicida DMI-Imidazol con actividad erradicante, pero no sistémica, y su modo de acción se basa en la inhibición de la ruta de la biosíntesis del ergosterol (Ma y Michailides, 2005). Este fungicida se ha usado como un protectante o erradicante (Estrada *et al.*, 1996), además de usarse en combinación con agua caliente como un tratamiento postcosecha en frutos de mango con destino final a países de la Unión Europea (Arauz, 2000; Oosthuysen, 2000; Dang *et al.*, 2008; Prusky *et al.*, 2009; Swart *et al.*, 2009). Según Arauz (2000), la efectividad de este fungicida bajo condiciones de campo varía de 65 a 94%, con una alta y moderada presión de la enfermedad, respectivamente. En Taiwán, la frecuencia de aplicaciones de procloraz por ciclo es de 1 a 16, dependiendo de la incidencia de la enfermedad (Kuo, 2001).

Control postcosecha de la antracnosis

Tradicionalmente, el control postcosecha de la antracnosis del mango tiene como objetivo la erradicación de infecciones latentes de *Colletotrichum* presentes en los frutos. Esta

erradicación se alcanza con los tratamientos térmicos y químicos, o una combinación de ambos (McMillan, 1987; Dodd *et al.*, 1997; Arauz, 2000; Ploetz, 2003).

La inmersión de la fruta en agua caliente (50 - 55 °C durante 3 - 15 min) es un tratamiento moderadamente eficiente. Sin embargo, una de las ventajas de este tratamiento se observa en la ausencia de residuos químicos en los frutos, por lo que es una opción disponible para control de la antracnosis en huertos de mango con producción orgánica para mercados de EE.UU. (McGuire, 1991). Es importante considerar que los diversos cultivares de mango varían en su nivel de tolerancia al agua caliente, por lo que las temperaturas y los tiempos son críticos, ya que los frutos pueden dañarse fácilmente por la sobreexposición al calor (Ploetz, 2003; Prusky *et al.*, 2009).

Cuando los tratamientos de agua caliente se combinan con fungicidas, la temperatura del agua debe oscilar entre 52 y 53 °C. Los tratamientos de inmersión en fungicidas con agua fría han mostrado menor efectividad (Ploetz, 2003; Prusky *et al.*, 2009).

Varias clases químicas de fungicidas se han aplicado en condiciones postcosecha para el control de la antracnosis del mango. En el caso de los fungicidas pertenecientes a la clase MBC, el benomil y el tiabendazol han mostrado ser altamente efectivos a concentraciones de 500 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 1000-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, aunque el uso del benomil no está permitido en la actualidad (Arauz, 2000). Otra ventaja del uso de fungicidas MBC en tratamiento postcosecha, es que esta clase de fungicidas también son efectivos para el control de la pudrición postcosecha del pedúnculo (Estrada *et al.*, 1996), la cual es causada por diversas especies de la familia Botryosphaeriaceae (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2012). Por otra parte, el fungicida DMI-procloraz

está registrado para usarse en frutos de mango con destino a países de la Unión Europea (Arauz, 2000).

La aplicación de boratos es otra alternativa que ha mostrado efectos positivos en el control postcosecha de la antracnosis del mango, ya que este tratamiento estimula la acumulación de oxígeno reactivo en las esporas del hongo, resultando en daño mitocondrial y, por ende, en la inhibición de la germinación de esporas (Shi *et al.*, 2011, 2012).

Otros tratamientos postcosecha que han exhibido cierto control sobre la antracnosis son la aplicación de ácido salicílico (Zeng *et al.*, 2006), ácido oxálico (Zheng *et al.*, 2007) y quitosán (Alla-Abd y Haggag, 2010). Sin embargo, se necesita mayor investigación para determinar el mecanismo de acción que estos compuestos ejercen sobre este hongo fitopatógeno.

LITERATURA CITADA

- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., and Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93: 579–587.
- Ah-You, N., Gagnevin, L., Pruvost, O., Myint, N.T., and Johnson, G. I. 2007 First report in Myanmar of *Xanthomonas axonopodis* pv. *mangiferaeindicae* causing mango bacterial canker on *Mangifera indica*. *Plant Disease* 91: 1686.
- Akem, C. N. 2006. Mango anthracnose disease: Present status and future research priorities. *Plant Pathology Journal* 5(3): 266-273.

- Alla-Abd, M. A., and Haggag, W. M. 2010. New safe methods for controlling anthracnose disease of mango (*Mangifera indica* L.) fruits caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Journal of American Science* 8(8): 361-367.
- Anita and Chaubey, A. K. 2003. Influence of soil temperature and moisture on population dynamics of ectoparasitic nematodes infesting *Mangifera indica*. *Annals of Plant Protection Sciences* 11:181–183.
- Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84(6): 600-611.
- Arauz, L. F., Wang, A., Durán, J. A., and Monterrey, M. 1994. Causas de pérdidas poscosecha de mango a nivel mayorista en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 18: 47-51.
- Arauz, L. F. 1999. Optimización económica del combate de enfermedades en cultivos: un ejemplo basado en la antracnosis del fruto del mango. (Abstr.) XI Congreso Nacional de Agronomía y Recursos Naturales, IV Congr. Nacional Fitopatol. San José, Costa Rica. Vol. II. p. 61.
- Avila-Adame, C., Olaya, G., and Koller, W. 2003. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobirulin-related QoI fungicides. *Plant Disease* 87: 1426-1432.
- Bugante, R. D, Jr., and Lizada, M. C. C. 1996. Disease control in Philippine ‘Carabao’ mango with preharvest bagging and postharvest hot water treatment. *Acta Horticulturae* 455: 797-804.

- Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Waller, J., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., McKenzie, E. H. C., and Johnston, P. R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183-204.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., and Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum*- Current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181-213.
- Campbell, R. J. 1992. A Guide to Mangoes in Florida. Fairchild Tropical Garden, Miami, Florida.
- Chacko, E. K., and Ananthanarayanan, T. V. 1985. Accumulation of reserve substances in *Mangifera indica* L. during flower initiation. *Z. Pflanzenphysiol.* 106: 281-285.
- Cook, A. A. 1975. Diseases of Tropical and Subtropical Fruits and Nuts. Hafner Press, New York. 317 p.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., Johnston, P. R., Weir, B. S., Tan, Y. P., Shivas, R. G., and Crous, P. W. 2012a. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1-36.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., and Crous, P. W. 2012b. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37-113.
- Dang, K. T. H., Singh, Z., and Swinny, E. E. 2008. Impact of postharvest disease control methods and cold storage on volatiles, color development and fruit quality in ripe “Kensington Pride” mangoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(22): 10667-10674.

- Diedhiou P. M., Diallo, Y., Faye, R., Mbengue, A. A., and Sene, A. 2014. Efficacy of different fungicides against mango anthracnose in Senegalese Soudanian agroclimate. *American Journal of Plant Sciences* 5: 2224-2229.
- Dodd, J. C., Estrada, A. B., Matcham, J., Jefferies, P., and Jeger, M. J. 1991. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. *Plant Pathology* 40: 568–575.
- Dodd, J. C., Prusky, D., and Jeffries, P. 1997. Fruit diseases. *In*: Litz, R.E. (ed.) *The Mango: Botany, Production and Uses*. CABI. pp. 257-280.
- Estrada, A.B., Jeffries, P., and Dodd, J.C. 1996. Field evaluation of a predictive model to control anthracnose disease of mango in the Philippines. *Plant Pathology* 45: 294-301.
- FAOSTAT. 2010. Disponible en <http://www.fao.org/default.htm>. Consultado en Febrero 2014.
- Farungsang, U., and Farungsang, N. 1992. Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp. associated with rambutan and mango fruit rot in Thailand. *Acta Horticulturae* 321: 891-897.
- Fitzell, R. D. 1979. *Colletotrichum acutatum* as a cause of anthracnose of mango in New South Wales. *Plant Disease Reporter* 63: 1067–1070.
- Fitzell, R. D., and Peak, C. M. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. *Annals of Applied Biology* 104: 53–59.
- FRAC. 2012. List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides. Disponible en: <http://www.frac.info/>
- Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2001. Epidemiology and control of mango bacterial black spot. *Plant Disease* 85: 928–935.

- Govender, V., Korsten, L., and Sivakumar, D. 2005. Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biology and Technology* 38: 57-65.
- Govender, V., and Korsten, L. 2006. Evaluation of different formulations of *Bacillus licheniformis* in mango pack house trials. *Biological Control* 37: 237–242.
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F., y Vaquera-Huerta, H. 2003. Resistencia a benomil y tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en cinco regiones de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 260-266.
- Hasan, N. S. A., Perveen, R., Manzoor, S. A., and Abbas, Z. 2014. Occurance of mango anthracnose on inflorescence in Multan (Punjab) and it's *in vitro* control through various fungicides. *International Journal of Biosciences* 4(7): 184-191.
- Hofman, P. J., Smith, L. G., Joyce, D. C., Johnson, G. I., and Meiburg, G. F. 1997. Bagging of mango (*Mangifera indica* cv. 'Keitt') fruit influences fruit quality and mineral composition. *Postharvest Biology and Technology* 12: 83-91.
- Honger, J. O., Offei, S. K., Oduro, K. A., Odamtten, G. T., and Nyaku, S. T. 2014. Identification and species status of the mango biotype of *Colletotrichum gloeosporioides* in Ghana. *European Journal of Plant Pathology* 140(3): 455-467.
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., and Prihastuti, H. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39: 1-17.

- Hyde, K. D., Cai, L., Cannon, P. F., Crouch, J. A., Crous, P. W., Damm, U., Goodwin, P. H., Chen, H., Johnston, P. R., Jones, E. B. G., Liu, Z. Y., McKenzie, E. H. C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S. R., Pfenning, L. H., Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., and Chukeatirote, E. 2009b. *Colletotrichum*- names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.
- Inada, M., Ishii, H., Chung, W. H., Yamada, T., Yamaguchi, J., and Furuta, A. 2008. Occurrence of strobirulin resistant strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), the causal fungus of strawberry anthracnose. *Japanese Journal of Phytopathology* 74(2): 114-117.
- Jadeja, K. B., and Vaisnav, M. U. 1984. Effective spray schedule for control of anthracnose and leaf blight of mango. *Indian Journal of Plant Protection* 12: 93-96.
- James, R. S., Ray, J., Tan, Y. P., and Shivas, R. G. 2014. *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory, Australia. *Australasian Plant Disease Notes*. DOI 01.1007/s13314-014-0138-x.
- Jeffries, P., Dodd, J. C., Jeger, M. J., and Plumbley, R. A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology* 39: 343–366.
- Kefialew, Y., and Ayalew, A. 2008. Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology* 50: 8-11.
- Kongtragoul, P., Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Izumi, Y., and Akimitsu, K. 2011. Mutation at codon 198 of *TUB2* gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides*

- causing mango anthracnose in Thailand. *Journal of Plant Protection Research* 51(4): 377-384.
- Kumar, A. S., Reddy, N. P. E., and Reddy, K. H. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathology Bulletin* 16: 157-160.
- Kuo, K. C. 2001. Sensitivity of mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, to the fungicide prochloraz in Taiwan. *Proceedings of the National Science Council* 25(3): 174-179.
- Lim, T. K., and Khoo, K. C. 1985. Diseases and disorders of mango in Malaysia. Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia. 101 p.
- Lima, N. B., Batista, M. V. A., Morais, M. A. Jr., Barbosa, M. A. G., Michereff, S. J., Hyde, K. D., and Câmara M. P. S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 61:75-88.
- Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853-863.
- McGuire, R. G. 1991. Concomitant decay reductions when mangoes are treated with heat to control infestations of Caribbean fruit flies. *Plant Disease* 75: 946-949.
- McMillan, Jr, R. T. 1984. Control of mango anthracnose with foliar sprays. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 97: 344-345.
- McMillan, R. T. Jr. 1987. Effectiveness of various postharvest treatments for mango decay control. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 100: 7-9.

- Miranda, J. L. 1995. Estudios de inducción de floración en Guatemala. Proc. Seminario Int. Cultivo Mango, 2nd. Puntarenas, Costa Rica. 35 p.
- Mora-Aguilera, J. A., Vega, P. A., y D. Téliz-Ortiz. 1998. Enfermedades del Mango. GIIM (Grupo Interdisciplinario de Investigación en Mango). *In: El mango y su manejo integrado en Michoacán*. Téliz Ortiz, D. (Ed.). Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. pp 18-44.
- Mitkowski, N. A., Madeiras, A. M., Chaves, A., and Wick, R. 2009. Fungicide sensitivity of *Colletotrichum cereale* isolated from turfgrasses in the Northeastern United States. *Applied Turfgrass Science* 6(1): 917-927.
- Mukherjee, S. K., and Litz, R. E. 2009. Fruit Diseases. *In: The Mango: Botany, Production and Uses*. Litz, R. E. (ed.). CABI Publishing. London, UK. pp: 1-18.
- Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Miyake, C., Izumi, Y., Akitmitsu, K., and Kongtragoul, P. 2010. Point mutations in the beta-tubulin gene conferred carbendazim-resistant phenotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* causing ‘Nam Dok Mai’ mango anthracnose. *Journal of Agricultural Technology* 6(2): 365-378.
- Nunez-Elisea, R. 1985. Flowering and fruit set of a monembryonic and a polyembryonic mango as influenced by potassium nitrate sprays and shoot decapitation. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 98: 179-183.
- Nunez-Elisea, R., Davenport, T. L., and Caldeira, M. L. 1993. Bud initiation and morphogenesis in ‘Tommy Atkins’ mango as affected by temperature and triazole growth retardants. *Acta Horticulturae* 341: 192-198.

- Oosthuysen, S. A. 2000. Differences in the effect on various packline fungicidal treatments on the manifestation of disease in mango. *Acta Horticulturae* 509: 725-731.
- Pandey, A., Yadava, L. P., Mishra, R. K., Pandey, B. K., Muthukumar, M., and Chauhan, U. K. 2012. Studies on the incident and pathogenesis of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causes anthracnose of mango. *International Journal of Science and Nature* 3(2): 220-232.
- 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.
- Paull, R. E., and Duarte, O. 2011. Tropical Fruits. Second Edition. Volume 1. CABI Publishing. London, UK. 400 p.
- Peres, N. A. R., Souza, N. L., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from Citrus. *Plant Disease* 88: 125-130.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44:33-43.
- Ploetz, R. C. 2003. Diseases of mango. *In: Diseases of Tropical Fruit Crops*. Ploetz, R. C (ed.) CABI Publishing. London, UK. pp. 327–363.
- Ploetz, R. C., and Freeman, S. 2009. Foliar, Floral, and Soilborne Diseases. *In: Litz, R. E (ed.) The Mango: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing. London, UK. pp: 231-302.
- Ploetz, R. C., Zentmyer, G. A., Nishijima, W., Rohrbach, K., and Ohr, H. D. 1994. *Compendium of Tropical Fruit Diseases*. APS Press, St Paul, Minnesota. USA. 118 p.

- Prakash, O. 2004. Diseases and Disorders of Mango and their Management. *In: Diseases of Fruits and Vegetables, Volume 1.* Naqvi, S. A. M. H (ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 511-619.
- Prusky, D., Kobiler, I., Miyara, I., and Alkan, N. 2009. Fruit Diseases. *In: Litz, R. E (ed.) The Mango: Botany, Production and Uses.* CABI Publishing. London, UK. pp: 210-230.
- Ray, S. K., Das, S., Hasan, M. A., and Jha, S. 2009. Efficacy of different fungicides for the management of anthracnose of mango on old and rejuvenated orchard in West Bengal. *Acta Horticulturae* 820: 529-534.
- Reddy, S. E., and Majmudar, A. 1985. Tracking phosphorus patterns in mango (*Mangifera indica*) and possible relations to floral induction. *Fertilizer Research* 6: 225-234.
- Rojas, E. I., Rehner, S. A., Samuels, G. J., Van Bael, S. A., Herre, E. A., Cannon, P., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y., Peng, Y, Q., and Sha, T. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. associated with *Theobroma cacao* and others plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102(6): 1318-1338.
- Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Nieto-Ángel, D., and Acosta-Ramos, M. 2008. Virulence and genetic variation of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. on mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26(1): 21-26.
- Sanders, G. M., Korsten, L., and Wehner, F. C. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 106: 745-752.

- Sandoval-Sánchez, M., Nieto-Ángel, D., Sandoval-Islas, J. S., Téliz-Ortiz, D., Orozco-Santos, M., and Silva-Rojas, V. 2013. Fungi associated to stem-end rot and dieback of mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-63.
- Sharma, G., Kumar, N., Weir, B. S., Hyde, K. D., and Shenoy, B. D. 2013. The *ApMat* marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Diversity* 61: 117-138.
- Sharma, G., Kumar, N., and Shenoy, B. D. 2014. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using *ApMat* marker. *Fungal Diversity* DOI 10.1007/s13225-014-0312-7.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2013. Disponible en www.siap.sagarpa.gob.mx (Consultado en Junio 2014).
- Senghor, A. L., Liang, W. J., and Ho, W. C. 2007. Integrated control of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit in Taiwan by the combination of *Bacillus subtilis* and fruit bagging. *Biocontrol Science and Technology* 17(8): 865-870.
- Shi, X., Li, B., Qin, G., and Tian, S. 2011. Antifungal activity and possible mode of action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. *Plant Disease* 95(1): 63-69.
- Shi, X., Li, B., Qin, G., and Tian, S. 2012. Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores. *Postharvest Biology and Technology* 67: 138-143.
- Shu, Z. H., and Sheen, T. F. 1987. Floral induction of axillary buds of mango as affected by temperature. *Scientia Horticulturae* 31: 81-87.
- Simmonds, J. H. 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agriculture and Animal Science* 22: 437-459.

- Snowdon, A. L. 1990. A Colour Atlas of Post-harvest Diseases and Disorders of Fruit and Vegetables: General introduction and fruits. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 302 p.
- Spalding, D. H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. *Plant Disease* 66: 1185-1186.
- Steyn, P. L., Viljoen, N. M., and Kotze, J. M. 1974. The causal organisms of bacterial black-spot of mangoes. *Phytopathology* 64: 1400-1404.
- Swart, S. H., Serfontein, J. J., Swart, G., and Labuschagne, C. 2009. Chemical control of post-harvest diseases of mango: the effect of fludioxinil and prochloraz on soft brown rot, stem-end rot and anthracnose. *Acta Horticulturae* 820: 503-509.
- Taba, S., Takaesu, K., Ooshiro, A., Moromizato, Z., and Takushi, T. 2004. Anthracnose of mango caused by *Colletotrichum acutatum*. *Japanese Journal of Tropical Agriculture* 48: 57-61.
- Udayanga, D., Manamgoda, D. S., Liu, X., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits?. *Fungal Diversity* 61: 165-179.
- Vieira, W. A. S., Michereff, S. J., de Moraes, Jr. M. A., Hyde, K. D. and Câmara, M. P. S. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 67(1): 181-202.
- Villegas-Monter, A., y Mora-Aguilera, J. A. 2011. Avances de la fruticultura en México. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 179-186
- Weir, B. S., Johnston, P.R., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.

- Wong, F. P., Midland, S. L., and de la Cerda, K. 2007. Occurrence and distribution of QoI resistant isolates of *Colletotrichum cereale* from annual bluegrass in California. *Plant Disease* 91: 1536-1546.
- Xu, D. G., Pan, R. Q., and Zheng, Z. 2004. Monitoring of the resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango anthracnose to the fungicide carbendazim. *Journal of South China Agricultural University* 25: 35-37.
- Yang, Y., He, S. H., Zhang, S. J., and Hu, M. J. 2008. Resistance of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* to carbendazim in Hainan province. *Chinese Journal of Tropical Crops* 29: 73-77.
- Young, J. R., Tomaso-Peterson, M., de la Cerda, K. A., and Wong, F. P. 2010. Two mutations in *B-tubulin 2* gene associated thiophanate-methyl resistance in *Colletotrichum cereale* isolates from creeping bentgrass in Mississippi and Alabama. *Plant Disease* 94: 207-212.
- Zeng K. Z., Cao, J., and Jiang, W. 2006. Enhancing disease resistance in harvested mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Matisu') fruit by salicylic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(5): 694-698.
- Zhan, R.L., Li, W., and Zheng, F. C. 2005. Studies on carbendazim-resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit. *Acta Phytopylacica Sinica* 32(1): 71-76.
- Zhan, R. L., and Huang, J. S. 2007. Cloning of a carbendazim-resistant gene from *Colletotrichum gloeosporioides* of mango in South China. *African Journal of Biotechnology* 6(2): 143-147.
- Zhang, L. H., Li, M., Gao, Z. Y., Zhang, Z. K., Yang, F. Z., Xie, Y. X., Hu, M. J., and Yang, Y. 2013. Screening and cross-resistance analysis of alternative fungicides against

carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from mango (*Mangifera indica* L.). *Acta Horticulturae* 992: 415-421.

Zheng, X. L., Tian, S. P., Gidley, M. J., Yue, H., and Li, B. Q. 2007. Effects of exogenous oxalic acid on ripening and decay incidence in mango fruit during storage at room temperature. *Postharvest Biology and Technology* 45: 281-284.

CAPÍTULO I

DIVERSIDAD DE ESPECIES DE *Colletotrichum* CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL MANGO EN MÉXICO

RESUMEN

La antracnosis del mango, causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad pre- y postcosecha más importante de este frutal en la mayoría de las áreas productoras del mundo. En México, la antracnosis del mango se ha asociado solo a *C. gloeosporioides* y *C. asianum*. En este estudio, se utilizó caracterización fenotípica, patogénica y análisis de secuencias *Apn2*/MAT IGS con el objetivo de identificar las especies de *Colletotrichum* responsables de causar la antracnosis del mango en México. De 2010 a 2013 se obtuvo un total de 100 aislados de *Colletotrichum*, a partir de tejidos de mango sintomáticos recolectados en los principales estados productores de México. Los resultados de la caracterización morfológica y cultural indicaron que todos los aislados usados en este estudio pertenecen al complejo de especies de *Colletotrichum gloeosporioides*. El análisis filogenético generado con las secuencias *Apn2*/MAT IGS de 38 aislados reveló que *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola* son las especies asociadas a los síntomas de esta enfermedad. Las especies *C. dianesei*, *C. tropicale* y *C. fructicola*, identificadas en este estudio, se reportan por primera vez en asociación con síntomas de antracnosis en tejidos de mango en México. Las pruebas de patogenicidad en frutos de mango cv. Manila mostraron que todos los aislados en este estudio fueron capaces de inducir lesiones típicas de antracnosis.

Palabras clave: *Mangifera indica*, *Colletotrichum*, *Apn2*/Mat IGS, filogenia, patogenicidad.

CHAPTER I

DIVERSITY OF *Colletotrichum* SPECIES CAUSING MANGO ANTHRACNOSE IN MEXICO

ABSTRACT

Mango anthracnose, caused by *Colletotrichum* spp., is the most significant disease of mango in almost all production areas around the world. In Mexico, mango anthracnose has been only attributed to *C. gloeosporioides* y *C. asianum*. In this study, phenotypic and pathogenic characterizations as well as *Apn2*/MAT IGS sequence-data were used to identify the *Colletotrichum* species associated to mango anthracnose. During the years 2010-2013, a total of 100 *Colletotrichum* isolates were obtained from mango tissues with typical anthracnose lesions across the major mango production areas in Mexico. Based on morphological and cultural characteristics, all isolates were identified in the *C. gloeosporioides* species complex. While, the phylogenetic analysis generated from *Apn2*/MAT IGS sequences of 38 isolates revealed that *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* and *C. fructicola* were associated with symptoms of mango anthracnose. In this study, *C. dianesei*, *C. tropicale* and *C. fructicola* are reported for the first time in association with mango tissues in Mexico. Pathogenicity tests on mango fruits cv. Manila showed that all isolates from this study could to induce anthracnose lesions.

Key words: *Mangifera indica*, *Colletotrichum*, *Apn2*/Mat IGS, phylogeny, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L.) es uno de los cinco cultivos económicamente más importantes a nivel mundial y se produce en países del trópico y subtropical (Mukherjee y Litz, 2009; Paull y Duarte, 2011). Durante el periodo 2000-2010, México se colocó como el cuarto mayor productor y el principal exportador de mango en el mundo (FAOSTAT, 2010). En México, la producción de mango se distribuye en 23 estados, sin embargo, más de 97% de la producción se concentra en 10 (Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz) (SIAP, 2013).

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad más importante del mango en casi todas las áreas de producción de este frutal, debido a que esta ocasiona daños en hojas, ramas, panículas y frutos (Arauz, 2000; Ploetz, 2003; Ploetz y Freeman, 2009; Paull y Duarte, 2011). Cuando la inflorescencia se infecta, la producción se reduce de manera drástica. La enfermedad se encuentra como infección quiescente en frutos inmaduros y desde el punto de vista económico, el daño que induce es significativo en la etapa de postcosecha (Prusky *et al.*, 2009). Asimismo, la incidencia de la enfermedad puede llegar casi a 100% en frutos producidos en áreas con alta humedad durante el periodo de floración y en particular en huertos de mango con manejo deficiente (Arauz, 2000; Ploetz y Freeman, 2009).

Los síntomas de antracnosis en huertos de mango se observan en hojas, ramas, panículas y frutos. En hojas, las lesiones son irregulares, necróticas, con frecuencia rodeadas por halos cloróticos y no delimitadas por las nervaduras. Las lesiones pueden coalescer y formar largas áreas necróticas, en especial a lo largo de los márgenes. Bajo condiciones favorables se pueden formar sobre las lesiones cuerpos fructíferos (acérvulos) del patógeno de color salmón a naranja. En ramas, los síntomas comienzan a manera de lesiones necróticas pequeñas oval-alargadas que se expanden y coalescen con el avance del tiempo. En infecciones severas, el hongo invade ramas y

causa muerte descendente. Lesiones pequeñas circulares, de color café oscuro a negro se desarrollan sobre panículas y pedúnculos. En panículas, las flores presentan pequeños puntos negros que se amplían gradualmente y se unen hasta causar tizón de flores. Los frutos pueden ser afectados en cualquier estado de su desarrollo. En tanto, la infección severa de frutos jóvenes se presenta a manera de momificación. Mientras que las infecciones en frutos más grandes permanecen latentes, hasta que los frutos maduran y la enfermedad se observa con la aparición de lesiones negras, irregulares y hundidas en la superficie de los frutos (Arauz, 2000; Ploetz, 2003; Prakash, 2004; Prusky *et al.*, 2009; Ploetz y Freeman, 2009).

La identificación apropiada de la especie del fitopatógeno es crítica para entender la epidemiología y el desarrollo de medidas efectivas de control de estas enfermedades (Cai *et al.*, 2009). La circunscripción e identificación de especies de *Colletotrichum* se ha basado históricamente en el rango de hospedantes, síntomas de la infección sobre hospedantes particulares, y en un conjunto de caracteres morfológicos (Hyde *et al.*, 2009 a, b). Sin embargo, el uso de caracteres taxonómicos convencionales en *Colletotrichum* ha sido problemático y ha fallado para identificar a las diversas especies crípticas que presenta este género de hongo fitopatógeno, por lo que las herramientas moleculares se han empleado para inferir las relaciones evolutivas de las especies de *Colletotrichum* (Hyde *et al.*, 2009 a, b; Phoulivong *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2012 a, b; Cannon *et al.*, 2012).

De acuerdo con estudios previos, la taxonomía de especies de *Colletotrichum* asociadas a tejidos de mango, había sido clarificada por la adopción de análisis filogenéticos multi-locus en conjunto con caracterización fenotípica, reportando principalmente a diferentes especies crípticas pertenecientes a los complejos *gloeosporioides* (*C. asianum*, *C. gloeosporioides*, *C. tropicale*, *C. fructicola*, *C. dianesei*, *C. siamense*, *C. endomangiferae*) (Phoulivong *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013; Honger *et al.*, 2014; Udayanga *et al.*, 2013; James *et al.*, 2014) *acutatum*

(*C. fioriniae* y *C. simmondsii*) (Damm *et al.*, 2012b) y *boninense* (*C. karstii*) (Damm *et al.*, 2012a; Lima *et al.*, 2013). Asimismo, en estudios realizados por Sharma *et al.* (2013), Vieira *et al.* (2014) y Sharma *et al.* (2014), con aislados de *Colletotrichum* obtenidos de tejidos de mango, se concluyó que los datos de la secuencia del locus *Apn2/MAT* IGS proporcionan una mejor resolución filogenética de la diversidad de clados terminales, comparada con los seis genes concatenados (ACT, TUB2, CAL, CHS, GAPDH, ITS) para identificar especies pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides*.

En el caso de México, la antracnosis del mango se había atribuido exclusivamente a *C. gloeosporioides* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003; Rojas-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, en un estudio reciente realizado por Honger *et al.* (2014), se determinó, mediante análisis filogenético multilocus, que *C. asianum* se encuentra asociado a la antracnosis del mango en México. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la diversidad de especies de *Colletotrichum* asociadas a tejidos de mango con síntomas de antracnosis mediante caracterización fenotípica, análisis de secuencias *Apn2/MAT* IGS y pruebas de patogenicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Durante muestreos realizados en el período de 2010 a 2013 se recolectaron tejidos de mango (hojas, ramas y frutos) con síntomas típicos de antracnosis (Figura 1) en 100 huertos comerciales de los 10 principales estados productores (Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Tabasco y Veracruz) (Figura 2) y cultivares de mango (Ataulfo, Manila, Haden, Tommy Atkins, Kent y Keitt) en México.

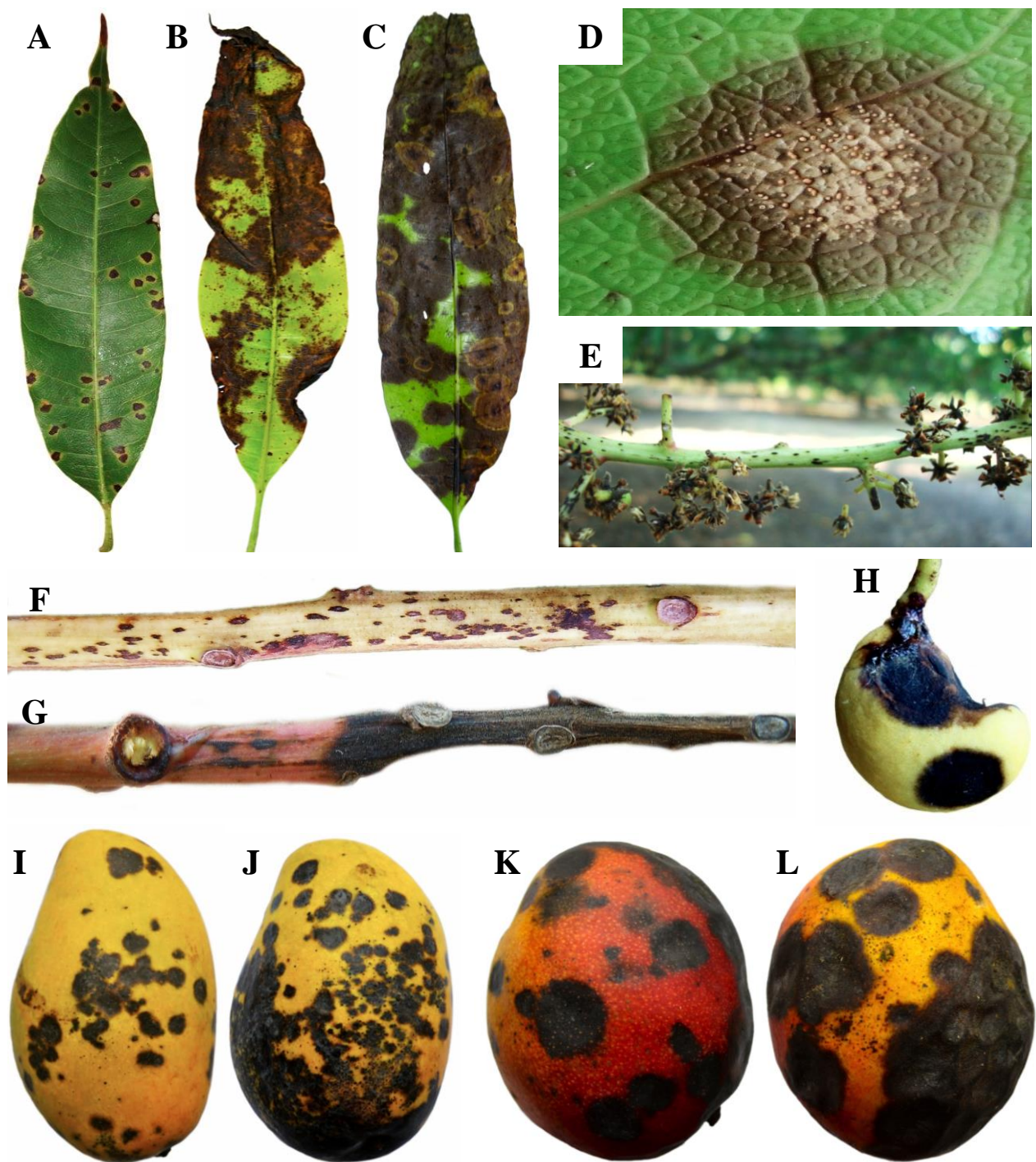


Figura 1. Síntomas y signos causados por *Colletotrichum* spp. en tejidos de mango de los cultivares Tommy Atkins (A), Ataulfo (B-F, H), Manila (I y J) y Haden (K y L). (A) Hoja con lesiones necróticas irregulares con halo amarillento, (B-C) hojas con atizomamiento, (D) acérvulos desarrollados sobre lesión foliar, (E) tizón en flores, (F) rama con lesiones necróticas, (G) rama con muerte descendente, (H-L) frutos con lesiones necróticas irregulares y hundidas.

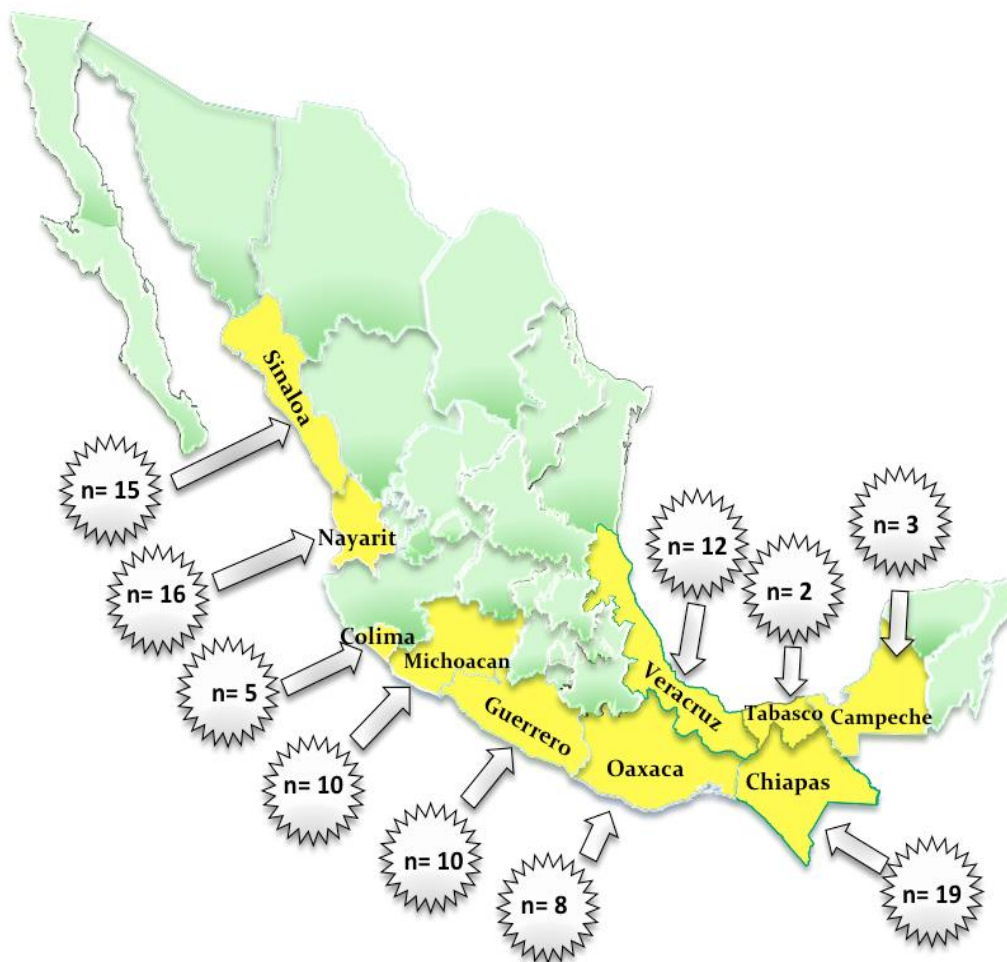


Figura 2. Localización en México de huertos comerciales de mango a partir de los cuales se recolectaron tejidos de mango con síntomas de antracnosis para la obtención de aislados de *Colletotrichum* spp. usados en este estudio. **n** = número de aislados obtenidos de cada estado.

Aislamiento, purificación y conservación de aislados

Los aislados de *Colletotrichum* spp. se obtuvieron mediante los procedimientos descritos por Cai *et al.* (2009) y Prihastuti *et al.* (2009), con algunas modificaciones. Se cortaron piezas de 5 x 5 mm a partir del área de avance de las lesiones en el tejido enfermo, se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) a 1% por 3 min, se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente estéril. Posteriormente, las piezas desinfectadas

se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, Difco[®], Becton Dickinson, Francia) a 2% con 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (SIGMA[®], EE.UU.).

Las cajas Petri se mantuvieron en incubación a 25 °C bajo condiciones de oscuridad, por 72 h. Después, se transfirieron discos miceliales (5 mm de diámetro) del borde de los crecimientos fúngicos activos asépticamente a nuevas cajas Petri con medio PDA y se incubaron a 25 °C por 7 días. Cultivos monoconidiales se obtuvieron mediante la transferencia de esporas germinadas en medio de cultivo agua-agar (AA) a cajas Petri con medio PDA fresco. Para las muestras de tejidos que presentaban esporulación abundante, cultivos monoconidiales se obtuvieron siguiendo la técnica recomendada por Goh *et al.* (1999).

Los aislados de *Colletotrichum* usados en este estudio se encuentran en la colección de cultivos de hongos fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Los cultivos se conservaron como suspensión de esporas y discos miceliales en 15% de glicerol a -80 °C.

Cuadro 1. Sitio, fecha de colecta, cultivar y tejido infectado de mango de los aislados de *Colletotrichum* incluidos en este estudio para caracterización fenotípica, patogénica y análisis de secuencia *Apn2*/MAT IGS.

Código del aislado	Localidad	Fecha de colecta	Cultivar	Tejido infectado
CHIS 1-3	Mazatán, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	hoja
CHIS 2-2	Huehuetán, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	hoja
CHIS 3-4	Huehuetán, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	fruto
CHIS 4-1	Mazatán, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	hoja
CHIS 5-3	Metapa de Domínguez, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	hoja
CHIS 6-1	Tuxtla Chico, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	fruto
CHIS 7-1	Frontera Hidalgo, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	hoja
CHIS 8-2	Ciudad Hidalgo, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	rama
CHIS 9-1	Ciudad Hidalgo, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	fruto
CHIS 10-1	Ciudad Hidalgo, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	fruto
CHIS 12-1	Tapachula, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	fruto
CHIS 13-5	Tapachula, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	hoja
CHIS 14-1	Villa Comaltitlan, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	hoja

Continuación del Cuadro 1

CHIS 15-2	Pijijiapan, Chiapas	Diciembre 2010	Manililla	fruto
CHIS 16-4	Pijijiapan, Chiapas	Diciembre 2010	Manililla	fruto
CHIS 17-2	Tonalá, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	fruto
CHIS 18-5	Mapastepec, Chiapas	Diciembre 2010	Manila	rama
CHIS 19-3	Pijijiapan, Chiapas	Diciembre 2010	Manililla	hoja
CHIS 20-3	Metapa de Domínguez, Chiapas	Diciembre 2010	Ataulfo	rama
VER 1-3	Puente Nacional, Veracruz	Marzo 2011	Tommy Atkins	hoja
VER 2-1	Puente Nacional, Veracruz	Marzo 2011	Manila	hoja
VER 3-3	Actopan, Veracruz	Marzo 2011	Manila	hoja
VER 4-3	Actopan, Veracruz	Marzo 2011	Manila	hoja
VER 5-1	Actopan, Veracruz	Marzo 2011	Manila	hoja
VER 6-2	Jamapá, Veracruz	Marzo 2011	Manila	rama
VER 7-3	Tierra blanca, Veracruz	Marzo 2011	Tommy Atkins	rama
VER 8-1	Tierra blanca, Veracruz	Marzo 2011	Manila	hoja
VER 9-1	Tierra blanca, Veracruz	Marzo 2011	Manila	rama
VER 10-1	Tierra blanca, Veracruz	Marzo 2011	Manila	hoja
VER 11-1	Jesús Carranza, Veracruz	Abril 2012	Manila	hoja
VER 12-1	Jesús Carranza, Veracruz	Abril 2012	Manila	hoja
MICH 2-2	Parácuaro, Michoacán	Mayo 2011	Haden	hoja
MICH 3-1	Parácuaro, Michoacán	Mayo 2011	Haden	fruto
MICH 6-1	Parácuaro, Michoacán	Mayo 2011	Tommy Atkins	hoja
MICH 7-2	Apatzingán, Michoacán	Mayo 2011	Haden	hoja
MICH 8-2	Nueva Italia, Michoacán	Mayo 2011	Tommy Atkins	hoja
MICH 9-2	Nueva Italia, Michoacán	Mayo 2011	Tommy Atkins	hoja
MICH 10-1	Nueva Italia, Michoacán	Mayo 2011	Tommy Atkins	hoja
MICH 11-2	Nuevo Urecho, Michoacán	Mayo 2011	Tommy Atkins	hoja
MICH 14-2	Nuevo Urecho, Michoacán	Mayo 2011	Haden	hoja
MICH 15-2	Nuevo Urecho, Michoacán	Mayo 2011	Haden	hoja
GRO 2-2	Tecpan de Galeana, Guerrero	Julio 2011	Haden	hoja
GRO 4-2	Tecpan de Galeana, Guerrero	Julio 2011	Haden	hoja
GRO 5-2	Tecpan de Galeana, Guerrero	Julio 2011	Haden	hoja
GRO 8-2	Tecpan de Galeana, Guerrero	Julio 2011	Tommy Atkins	hoja
GRO 10-2	Tecpan de Galeana, Guerrero	Julio 2011	Tommy Atkins	hoja
GRO 12-1	Cuajinicuilapa, Guerrero	Julio 2011	Haden	hoja
GRO 13-2	Cuajinicuilapa, Guerrero	Julio 2011	Tommy Atkins	hoja
GRO 15-2	Arcelia, Guerrero	Julio 2011	Tommy Atkins	hoja
GRO 16-1	Arcelia, Guerrero	Julio 2011	Haden	hoja
GRO 18-1	Arcelia, Guerrero	Julio 2011	Haden	hoja
COL 1-3	Armería, Colima	Mayo 2012	Haden	hoja
COL 2-3	Armería, Colima	Mayo 2012	Haden	hoja
COL 3-1	Armería, Colima	Mayo 2012	Ataulfo	hoja
COL 4-2	Armería, Colima	Mayo 2012	Tommy Atkins	hoja
COL 5-2	Armería, Colima	Mayo 2012	Tommy Atkins	hoja
OAX 2-2	Zanatepec, Oaxaca	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
OAX 3-2	Zanatepec, Oaxaca	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
OAX 4-1	Zanatepec, Oaxaca	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja

Continuación del Cuadro 1

OAX 5-2	Zanatepec, Oaxaca	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
OAX 6-3	Zanatepec, Oaxaca	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
OAX 9-2	Zanatepec, Oaxaca	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
OAX 12-1	Zanatepec, Oaxaca	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
OAX 13-2	Jalapa de Márquez, Oaxaca	Abril 2012	Ataulfo	hoja
NAY 2-2	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
NAY 3-1	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
NAY 4-1	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
NAY 7-2	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
NAY 8-3	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 9-1	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
NAY 10-2	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 13-3	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 14-3	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 15-2	Tepic, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 17-3	San Blas, Nayarit	Agosto 2012	Tommy Atkins	hoja
NAY 18-3	San Blas, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 19-3	San Blas, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 20-1	San Blas, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 21-3	San Blas, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
NAY 22-3	San Blas, Nayarit	Agosto 2012	Ataulfo	hoja
SIN 1-3	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Kent	hoja
SIN 2-1	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Kent	hoja
SIN 3-4	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Kent	hoja
SIN 4-1	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Kent	hoja
SIN 5-1	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Kent	hoja
SIN 13-3	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Keitt	hoja
SIN 14-1	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Keitt	hoja
SIN 16-2	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Kent	hoja
SIN 17-3	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Kent	hoja
SIN 18-2	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Keitt	hoja
SIN 19-1	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Keitt	hoja
SIN 20-3	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Keitt	hoja
SIN 22-3	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Kent	hoja
SIN 23-3	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Keitt	hoja
SIN 24-1	Ahome, Sinaloa	Abril 2012	Keitt	hoja
TAB 1	Frontera, Tabasco	Mayo 2013	Manila	hoja
TAB 2	Frontera, Tabasco	Mayo 2013	Tommy Atkins	hoja
CAM 1	Campeche, Campeche	Mayo 2013	Manila	hoja
CAM 2	Chamotón, Campeche	Mayo 2013	Manila	hoja
CAM 4	Cd. del Carmen Campeche	Mayo 2013	Tommy Atkins	hoja

Caracterización morfológica y cultural

Los caracteres macroscópicos y microscópicos se examinaron para los 100 aislados de *Colletotrichum* de mango. Todos los aislados se cultivaron en medio PDA a partir de suspensiones conidiales y discos miceliales que se encontraban almacenadas en glicerol al 15% a -80 °C.

Para determinar la tasa de crecimiento micelial de cada aislado, discos miceliales (5 mm de diámetro) de cada aislado monoconidial, obtenidos del margen de cultivos con crecimiento activo de 5 días, se transfirieron asépticamente a medio de cultivo PDA y MEA (Difco[®], Becton Dickinson, Francia). Los cultivos se incubaron a 28 °C bajo oscuridad continúa. El diámetro del crecimiento micelial de cada colonia se midió perpendicularmente y se registró cada 24 h durante 6 días. Se analizaron tres repeticiones de cultivos de cada aislado. En el periodo de incubación se midió el diámetro micelial para estimar la tasa de crecimiento (k), la cual se calculó con la función de crecimiento lineal $y = kx + c$ (donde y es la distancia, x es el tiempo y c el factor constante) y se expresó en milímetros por día (mm día^{-1}) (Zeravakis *et al.*, 2001). Las colonias con 6 días de crecimiento se caracterizaron visualmente y se registró el color de la colonia y las masas conidiales. El experimento completo se realizó dos veces.

Para estudiar la morfología conidial, se realizaron montajes de esporas en ácido láctico, a partir de las colonias con crecimiento de 10 días, y se examinaron en un microscopio compuesto (Nikon Eclipse E400[®], EE.UU.). El sistema de análisis de imágenes Motic Image Plus v. 3.0 (Motic Group Co.[®], China) se usó para determinar la forma y el tamaño (largo x ancho) de 50 conidios de cada aislado. De la medida de los conidios se calculó la media y la desviación estándar.

Extracción de DNA, amplificación por PCR y secuenciación

El DNA genómico se extrajo usando el método del bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB) descrito por Doyle y Doyle (1987, 1990) con algunas modificaciones. Para esto, 38 aislados de *Colletotrichum* se seleccionaron aleatoriamente y se cultivaron en medio PDA por 7 días a 28 °C en oscuridad. Una pequeña cantidad de micelio aéreo se raspó de la superficie de la colonia, usando una punta estéril de micropipeta, y se suspendió en 1 mL de la solución amortiguadora de extracción de bromuro de cetil-trimetil-amonio (100 mM tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 25 mM EDTA, 2% CTAB) (CTAB; SIGMA[®] Chemicals, EE.UU.). Los microtubos se pasaron por vortex durante 10 s y se incubaron a 60 °C por 60 min. Después, se agregaron 500 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) (Sigma[®] Chemicals, EE.UU.) a la mezcla, se dio un vórtex por 10 s y se centrifugó por 10 min a 10000 rpm. Posteriormente, se transfirió una porción de 600 µL de la fase superior a un nuevo tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 mL y se agregaron 500 µL de isopropanol absoluto frío. La mezcla se incubó a 37 °C por 30 min. El DNA se precipitó con la adición de un volumen igual de isopropanol y se almacenó durante 12 h, a -20 °C. Después, el DNA se sedimentó mediante centrifugación a 10000 rpm por 30 min, se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 70% de etanol, se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 30 min y se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas. La calidad y concentración del DNA se verificó mediante espectrofotometría usando un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific[®], EE.UU.), en el cual los valores de las relaciones 260/280 y 230/260 variaron de 1.6 a 2. Finalmente, el DNA se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

La amplificación de la secuencia *Apn2*/MAT IGS se realizó de acuerdo con los parámetros de ciclado e iniciadores especificados por Doyle *et al.* (2013). Los productos de PCR se limpiaron mediante una reacción enzimática con ExoSAP-ITTM (Affymetrix[®], EE.UU.). Se mezclaron 5 µL del producto de PCR con 2 µL de ExoSAP, obteniendo un volumen final de 7

μL; posteriormente se incubaron en un termociclador (Biorad®, México) a 37 °C por 15 min, para que las enzimas de ExoSAP degradaran el remanente de iniciadores y nucleótidos no utilizados en la reacción de PCR. A continuación se inactivaron las enzimas de ExoSAP a 80 °C por 15 min y se determinó la concentración final de DNA en el producto de PCR, por espectrofotometría.

A partir de la concentración del producto de PCR se calculó la cantidad del templado a usar en una reacción de secuenciación. Para cada una de las reacciones (Forward y Reverse), se colocaron 18 μL de la solución amortiguadora BigDye Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems®, EE.UU.) más 2 μL de cada una de las muestras en los pozos de la placa de secuenciación. Después, se colocó la placa en el termociclador (Biorad®, México), con un programa que consistió en un ciclo a 96 °C por 1 min seguido de 25 ciclos a 96 °C por 10 s, 50 °C por 50 s, 60 °C por 4 min, finalmente a 4 °C. Los productos de secuenciación se lavaron por el método de precipitación con etanol/EDTA y finalmente la placa se colocó en el 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, EE.UU.).

Análisis filogenético

La calidad de la secuencia de nucleótidos y del ensamblado de secuencias contiguas se llevó a cabo utilizando el paquete de Staden (Staden *et al.*, 1998). Los alineamientos de secuencia múltiple de cada gen se generaron con ClustalW, usando el software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011), y se ajustaron manualmente para permitir la máxima similitud de secuencias.

La inferencia bayesiana se usó para reconstruir los árboles filogenéticos, usando Mr.Bayes 3. 2. 1 (Ronquist *et al.*, 2012), debido a que esta tiene ventajas significativas sobre otros métodos de análisis, como máxima verosimilitud y máxima parsimonia (Archibald *et al.*, 2013), además de que provee medidas de apoyo de clado como probabilidades posteriores, en lugar de muestreos

aleatorios (Weir *et al.*, 2012). El jModelTest 0. 1. 1 se utilizó para llevar a cabo la selección estadística de los modelos de mejor ajuste de sustitución de nucleótidos, utilizando el criterio de información bayesiana (Modelo TPM3uf) (Posada, 2008). Los alineamientos de secuencia múltiple de nucleótidos y el análisis de conjunto de datos se corrieron dos veces durante 5×10^7 generaciones. Las muestras se tomaron de la parte posterior de 1000 generaciones. La convergencia de los parámetros se comprobó por medio del programa de Tracer (Rambaut y Drummond, 2007), descartando el primer 25% de las generaciones. Las secuencias tipo de las especies de *Colletotrichum* obtenidas del GenBank se incluyeron en los análisis (Rojas *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013; Viera *et al.*, 2014). La secuencia de *C. horii* se usó como grupo externo en el análisis.

Prueba de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad para los 100 aislados de *Colletotrichum* se realizaron en frutos de mango cv. Manila, los cuales se encontraban en la primera fase de color de inicio de maduración. Ciento diez frutos se lavaron en agua corriente; se desinfestaron en una solución de hipoclorito de sodio a 1% por 2 min; se sumergieron en etanol a 70% por dos min, se enjuagaron dos veces en agua destilada estéril y se secaron en una campana de flujo laminar. Posteriormente, se realizaron dos heridas en cada fruto, con el uso de un palillo estéril (0.5 mm de diámetro) y se colocó una gota (20 μ L) de una suspensión de conidios (10^5 esporas mL^{-1}) de un aislado sobre la superficie de cada herida. Diez frutos que se inocularon únicamente con agua destilada estéril, sirvieron como testigo. Todos los frutos se incubaron a 25 °C en charolas de plástico que presentaban dos capas de papel humedecido con agua destilada estéril, y se guardaron en una bolsa de plástico. Después de 6 días de incubación, se registró la presencia de lesiones en los frutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología y caracteres de las colonias

Los caracteres morfológicos y las características de las colonias de los 100 aislados de *Colletotrichum* obtenidos de mango, en México, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características morfológicas y culturales de 100 aislados de *Colletotrichum* obtenidos de tejidos de mango con síntomas de antracnosis en huertos comerciales de México.

Aislado	Colonia				Conidio (n = 50)		
	Color		TC ^a (mm día ⁻¹)		Longitud (µm) media (min-max)	Ancho (µm) media (min-max)	Forma
	PDA ^b	MEA ^c	PDA	MEA			
CHIS 1-3	G ^d	G	10.15	14.24	14.23 (11.6-15.9)	3.67 (3.2-4.2)	Cilíndrica
CHIS 2-2	G	G	10.10	14.07	14.52 (12.6-18.7)	3.73 (3.2-4.2)	Cilíndrica
CHIS 3-4	G	G	10.02	13.98	14.80 (12.6-16.9)	3.80 (3.4-4.5)	Cilíndrica
CHIS 4-1	Bl ^e	G	10.53	13.88	13.88 (11.5-17.1)	3.64 (3.1-4.2)	Cilíndrica
CHIS 5-3	G	G	10.32	13.22	14.07 (12.3-17.6)	4.01 (3.5-4.3)	Cilíndrica
CHIS 6-1	G	Be ^f	9.60	12.68	17.22 (14.2-19.8)	3.61 (3.2-4.1)	Cilíndrica
CHIS 7-1	G	Be	10.04	10.67	16.52 (13.8-18.8)	3.88 (3.4-4.5)	Cilíndrica
CHIS 8-2	G	G	10.37	14.21	15.50 (12.9-18.8)	3.62 (3.1-4.2)	Cilíndrica
CHIS 9-1	G	G	10.59	13.55	15.00 (12.8-17.8)	3.73 (3.2-4.2)	Cilíndrica
CHIS 10-1	G	G	10.63	13.92	15.25 (11.6-18.3)	3.77 (3.2-4.3)	Cilíndrica
CHIS 12-1	G	G	10.48	14.24	15.25 (13.4-17.9)	3.91 (3.4-4.4)	Cilíndrica
CHIS 13-5	G	G	9.54	13.55	15.09 (13.1-17.7)	3.75 (3.2-4.4)	Cilíndrica
CHIS 14-1	G	G	10.83	14.39	14.38 (12.8-17.2)	4.01 (3.6-4.4)	Cilíndrica
CHIS 15-2	G	G	10.58	13.23	15.71 (12.9-17.9)	3.92 (3.2-4.3)	Cilíndrica
CHIS 16-4	Bl	Bl	10.35	14.01	15.89 (13.3-19.3)	4.01 (3.5-4.4)	Cilíndrica
CHIS 17-2	G	G	10.86	14.31	15.09 (12.8-17.4)	3.81 (3.3-4.4)	Cilíndrica
CHIS 18-5	Bl	Bl	9.91	13.41	15.11 (12.8-17.3)	3.86 (3.3-4.4)	Cilíndrica
CHIS 19-3	G	G	10.53	14.33	14.35 (12.6-16.8)	3.61 (3.2-4.3)	Cilíndrica
CHIS 20-3	G	G	10.32	14.28	14.55 (12.8-16.5)	3.80 (3.2-4.3)	Cilíndrica
VER 1-3	Bl	Bl	8.87	14.87	15.93 (13.2-19.2)	3.70 (3.4-4.1)	Cilíndrica
VER 2-1	G	G	9.71	12.98	14.47 (12.3-17.2)	3.63 (3.2-4.1)	Cilíndrica
VER 3-3	G	G	10.87	14.04	14.82 (13.2-18.6)	3.71 (3.2-4.3)	Cilíndrica
VER 4-3	G	Be	10.41	12.19	15.88 (14.7-18.1)	3.99 (3.7-4.3)	Cilíndrica
VER 5-1	G	G	10.64	14.79	15.77 (12.4-18.2)	3.66 (3.3-4.2)	Cilíndrica
VER 6-2	G	G	10.69	14.62	16.78 (13.1-18.9)	3.90 (3.4-4.3)	Cilíndrica
VER 7-3	G	Bl	10.60	11.89	17.85 (13.8-20.3)	3.58 (3.1-4.1)	Cilíndrica
VER 8-1	G	G	10.25	14.41	14.21 (12.3-16.5)	3.82 (3.2-4.4)	Cilíndrica
VER 9-1	G	G	10.98	14.87	13.85 (11.2-15.9)	3.61 (3.1-4.1)	Cilíndrica
VER 10-1	G	G	10.66	14.85	17.13 (14.3-21.9)	3.93 (3.4-4.4)	Cilíndrica
VER 11-1	G	G	11.53	14.77	15.48 (12.6-20.3)	3.76 (3.3-4.2)	Cilíndrica
VER 12-1	G	G	10.76	14.73	14.03 (12.3-17.5)	3.73 (3.2-4.5)	Cilíndrica
MICH 2-2	G	B	9.43	12.85	14.72 (12.0-17.5)	3.66 (3.2-4.4)	Cilíndrica
MICH 3-1	G	G	10.56	14.22	13.26 (11.2-15.9)	3.55 (3.2-4.2)	Cilíndrica

Continuación del Cuadro 2

MICH 6-1	G	G	10.88	13.47	12.74 (11.3-16.3)	3.62 (3.2-4.1)	Cilíndrica
MICH 7-2	G	G	8.99	13.18	13.30 (11.2-17.2)	3.52 (3.0-4.1)	Cilíndrica
MICH 8-2	G	G	9.51	13.92	17.14 (14.2-19.7)	4.09 (3.6-4.4)	Cilíndrica
MICH 9-2	G	G	10.10	13.74	14.92 (12.5-19.3)	3.83 (3.2-4.4)	Cilíndrica
MICH 10-1	G	G	10.52	13.42	13.54 (12.1-15.5)	3.59 (3.0-4.2)	Cilíndrica
MICH 11-2	G	G	9.92	13.85	14.56 (12.0-19.3)	3.78 (3.2-4.4)	Cilíndrica
MICH 14-2	G	G	10.67	14.93	18.45 (15.4-20.8)	4.48 (3.8-5.4)	Cilíndrica
MICH 15-2	G	G	10.44	14.79	15.50 (13.3-17.9)	3.80 (3.0-4.5)	Cilíndrica
GRO 2-2	G	G	10.09	13.86	14.71 (12.2-17.6)	3.69 (3.1-4.5)	Cilíndrica
GRO 4-2	G	G	9.21	14.90	14.49 (12.4-17.0)	3.51 (3.2-4.2)	Cilíndrica
GRO 5-2	G	G	9.64	13.12	14.91 (12.8-17.1)	3.72 (3.3-4.4)	Cilíndrica
GRO 8-2	G	G	10.45	14.36	15.74 (13.7-17.5)	3.66 (3.2-4.2)	Cilíndrica
GRO 10-2	G	G	10.66	13.49	13.33 (11.9-16.5)	3.69 (3.2-4.5)	Cilíndrica
GRO 12-1	G	G	11.66	15.03	14.39 (12.4-17.0)	3.66 (3.2-4.2)	Cilíndrica
GRO 13-2	G	G	10.25	14.36	13.73 (12.3-16.2)	3.82 (3.2-4.4)	Cilíndrica
GRO 15-2	G	G	9.35	12.89	14.30 (12.4-17.0)	3.66 (3.2-4.2)	Cilíndrica
GRO 16-1	G	G	10.40	13.87	14.39 (12.5-16.4)	3.70 (3.2-4.4)	Cilíndrica
GRO 18-1	G	G	10.75	13.21	16.74 (14.8-19.1)	3.72 (3.4-4.3)	Cilíndrica
COL 1-3	G	G	10.89	13.64	14.73 (12.3-17.8)	3.80 (3.2-4.3)	Cilíndrica
COL 2-3	G	G	10.92	14.27	13.91 (12.3-16.7)	3.64 (3.1-4.3)	Cilíndrica
COL 3-1	G	G	10.31	14.01	13.79 (11.7-16.5)	3.81 (3.2-4.3)	Cilíndrica
COL 4-2	G	G	9.98	13.22	13.97 (11.6-16.7)	3.62 (3.1-4.2)	Cilíndrica
COL 5-2	G	G	10.53	14.72	13.22 (11.5-15.2)	3.64 (3.2-4.2)	Cilíndrica
OAX 2-2	G	G	9.93	14.29	13.90 (12.6-16.1)	3.68 (3.3-4.2)	Cilíndrica
OAX 3-2	BI	BI	10.72	14.46	17.34 (14.7-19.7)	3.79 (3.3-4.3)	Cilíndrica
OAX 4-1	G	G	10.10	13.46	14.45 (12.8-17.2)	3.70 (3.1-4.2)	Cilíndrica
OAX 5-2	G	G	10.07	13.60	15.34 (12.8-18.8)	3.85 (3.4-4.3)	Cilíndrica
OAX 6-3	G	G	10.06	14.12	12.50 (11.1-13.7)	3.61 (3.2-4.2)	Cilíndrica
OAX 9-2	G	G	9.73	13.21	13.65 (11.9-16.4)	3.61 (3.1-4.1)	Cilíndrica
OAX 12-1	G	G	10.08	12.20	15.01 (12.7-19.5)	3.63 (3.3-4.2)	Cilíndrica
OAX 13-2	G	G	9.29	13.98	16.49 (13.9-19.1)	3.84 (3.3-4.3)	Cilíndrica
NAY 2-2	G	G	10.54	14.75	14.45 (12.3-18.6)	3.76 (3.2-4.4)	Cilíndrica
NAY 3-1	G	G	9.35	11.52	14.71 (12.2-17.6)	3.81 (3.2-4.3)	Cilíndrica
NAY 4-1	G	G	9.55	11.13	15.52 (12.6-18.2)	3.76 (3.1-4.2)	Cilíndrica
NAY 7-2	G	G	10.18	13.09	14.76 (12.0-17.3)	3.70 (3.2-4.3)	Cilíndrica
NAY 8-3	BI	BI	10.69	14.11	14.43 (12.8-17.1)	3.79 (3.4-4.3)	Cilíndrica
NAY 9-1	G	G	10.44	13.29	14.14 (12.1-17.7)	3.88 (3.4-4.5)	Cilíndrica
NAY 10-2	G	G	11.01	13.19	14.41 (12.8-18.1)	3.78 (3.2-4.4)	Cilíndrica
NAY 13-3	G	G	10.76	12.76	16.27 (12.6-19.5)	3.66 (3.1-4.2)	Cilíndrica
NAY 14-3	G	G	11.09	14.85	14.99 (12.2-18.2)	3.75 (3.2-4.3)	Cilíndrica
NAY 15-2	G	G	10.98	14.08	14.66 (12.4-17.5)	3.68 (3.2-4.3)	Cilíndrica
NAY 17-3	G	G	10.84	14.27	15.22 (12.2-17.4)	3.65 (3.2-4.4)	Cilíndrica
NAY 18-3	G	G	10.45	14.39	16.01 (13.4-18.7)	3.65 (3.2-4.2)	Cilíndrica
NAY 19-3	G	G	11.02	13.33	14.06 (12.5-15.9)	3.76 (3.4-4.4)	Cilíndrica
NAY 20-1	G	G	11.04	14.11	14.60 (12.6-18.4)	3.83 (3.1-4.5)	Cilíndrica
NAY 21-3	G	G	10.64	13.74	16.74 (13.4-19.7)	3.93 (3.4-4.5)	Cilíndrica
NAY 22-3	G	G	11.56	14.64	15.15 (12.4-20.6)	3.84 (3.2-4.4)	Cilíndrica
SIN 1-3	G	G	10.48	13.97	14.34 (13.1-16.6)	3.75 (3.4-4.4)	Cilíndrica
SIN 2-1	G	G	10.69	13.97	15.83 (12.1-19.9)	3.53 (3.1-4.2)	Cilíndrica
SIN 3-4	G	G	10.59	13.93	15.29 (12.9-17.9)	3.62 (3.0-4.5)	Cilíndrica

Continuación del Cuadro 2

SIN 4-1	G	G	10.02	13.54	15.83 (13.7-18.6)	3.71 (3.2-4.2)	Cilíndrica
SIN 5-1	G	G	10.34	14.09	14.25 (12.2-16.9)	3.63 (3.2-4.2)	Cilíndrica
SIN 13-3	G	G	10.54	13.76	14.59 (11.9-18.1)	3.91 (3.4-4.4)	Cilíndrica
SIN 14-1	G	G	9.36	13.60	15.92 (12.3-19.6)	3.88 (3.2-4.3)	Cilíndrica
SIN 16-2	G	G	10.10	14.92	17.77 (14.8-20.7)	3.87 (3.4-4.2)	Cilíndrica
SIN 17-3	Bl	G	8.38	11.53	16.68 (13.9-20.9)	3.69 (3.2-4.2)	Cilíndrica
SIN 18-2	Bl	G	10.43	14.23	17.23 (13.7-20.1)	3.90 (3.1-4.5)	Cilíndrica
SIN 19-1	G	G	10.54	13.18	13.64 (12.1-15.9)	3.98 (3.4-4.6)	Cilíndrica
SIN 20-3	G	G	9.24	14.27	17.12 (13.7-19.6)	3.93 (3.1-4.5)	Cilíndrica
SIN 22-3	G	G	8.99	14.89	16.94 (13.9-19.7)	3.91 (3.4-4.4)	Cilíndrica
SIN 23-3	G	G	9.07	14.87	16.35 (12.6-19.4)	3.89 (3.1-4.5)	Cilíndrica
SIN 24-1	G	G	10.43	14.91	15.36 (13.9-17.1)	4.05 (3.6-4.5)	Cilíndrica
TAB 1	G	G	9.24	13.55	14.37 (12.4-17.4)	3.80 (3.2-4.2)	Cilíndrica
TAB 2	G	G	9.59	13.25	14.54 (12.3-20.6)	3.78 (3.3-4.4)	Cilíndrica
CAM 1	G	G	8.96	12.19	15.25 (12.8-18.6)	3.79 (3.2-4.3)	Cilíndrica
CAM 2	G	G	10.12	14.37	14.44 (11.7-19.4)	3.87 (3.2-4.3)	Cilíndrica
CAM 4	G	G	11.02	14.67	14.20 (12.5-16.9)	3.89 (3.3-4.4)	Cilíndrica

^a= Tasa de crecimiento micelial (incubación a 28 °C en oscuridad continua).

^b= Medio de cultivo papa dextrosa agar (incubación a 28 °C en oscuridad continua).

^c= Medio de cultivo extracto de malta agar (incubación a 28 °C en oscuridad continua).

^d= Color gris.

^e= Color blanco.

^f= Color beige.

En medio de cultivo PDA, las colonias generalmente mostraron crecimiento denso, blanco a grisáceo y con una tasa de crecimiento micelial que varió de 8.38 a 11.66 mm día⁻¹ (media = 10.24 mm día⁻¹) (Figura 3). Mientras que en medio de cultivo MEA, las colonias presentaron una tasa de crecimiento micelial que fluctuó de 10.67 a 15.03 mm día⁻¹ (media = 13.77 mm día⁻¹), además de que exhibieron mayor variación en la coloración, ya que se observaron colonias con crecimiento blanco, gris y beige (Figura 4). Aunque el coeficiente de crecimiento de las colonias cultivadas en medio PDA coincidió con los rangos reportados por Weir *et al.* (2012), Lima *et al.* (2013), Sharma *et al.* (2013) y Vieira *et al.* (2014), para el caso de aislados de especies del complejo *C. gloeosporioides*, no fue posible comparar los caracteres de las colonias debido a la gran variación e inconsistencia en las metodologías seguidas en los diversos estudios de identificación de especies de *Colletotrichum*, como lo mencionaron Cai *et al.* (2009).

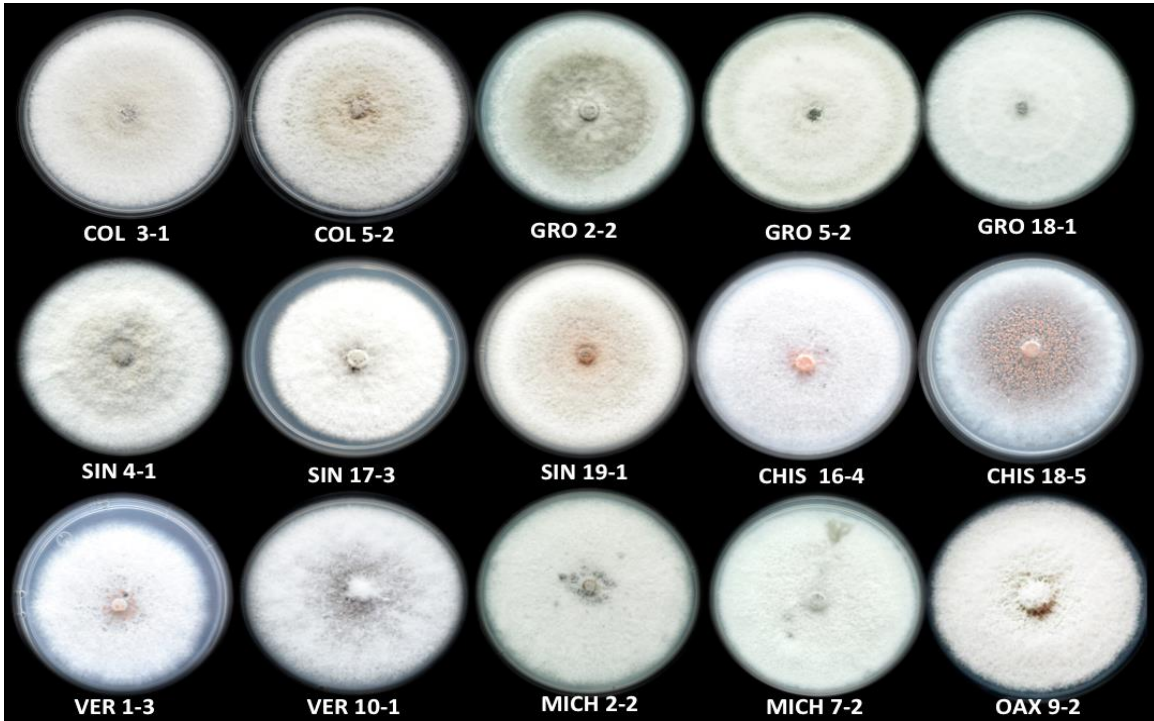


Figura 3. Colonias de *Colletotrichum* con 6 días de crecimiento en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), aisladas de tejidos de mango con síntomas de antracnosis.

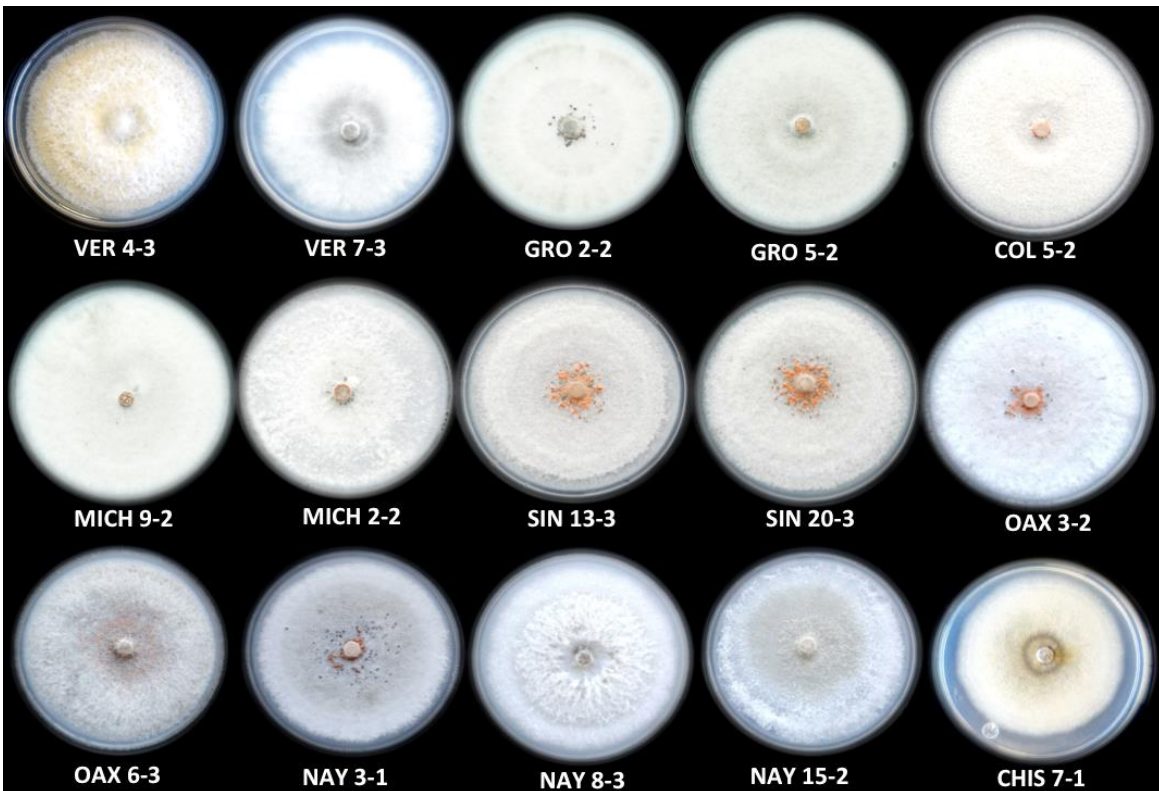


Figura 4. Colonias de *Colletotrichum* con 6 días de crecimiento en medio de cultivo extracto de malta agar (MEA), aisladas de tejidos de mango con síntomas de antracnosis.

Todos los aislados presentaron conidios hialinos, unicelulares, cilíndricos, con los extremos redondeados y con el hilo incospicuo (Figura 5). Asimismo, el intervalo de medidas promedio de los conidios de los aislados fue de 12.50-18.45 x 3.51-4.48 μm . Estos caracteres morfológicos coinciden con los intervalos reportados por Lima *et al.* (2013), Weir *et al.* (2012), Sharma *et al.* (2013) y Vieira *et al.* (2014), para el caso de aislados de especies pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides*.

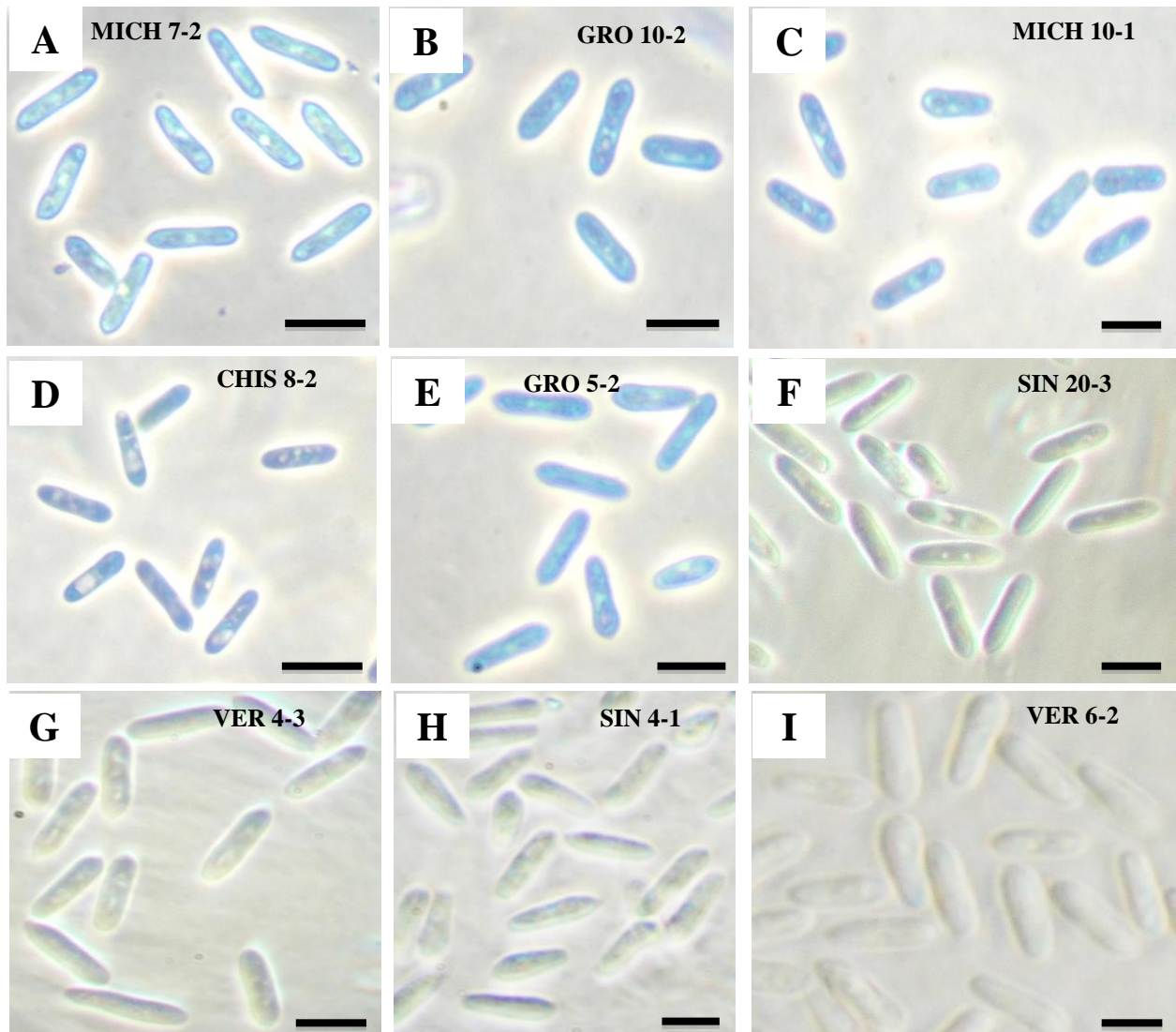


Figura 5. Conidios de *Colletotrichum* formados en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) después de 10 días de incubación a 28 °C y en oscuridad continua. (A-E) Microscopía de contraste de fases. (F-I) Microscopía de luz de campo brillante. Barras = 10 μm .

Ninguno de los caracteres morfológicos de las estructuras de reproducción asexual y de las colonias registrados en este trabajo sirvió para distinguir entre las diferentes especies dentro del complejo *C. gloeosporioides*. Lo anterior coincidió con lo reportado por Phoulivong *et al.* (2010), Weir *et al.* (2012) y Udayanga *et al.* (2013), quienes indicaron que el complejo *C. gloeosporioides* comprende especies indistinguibles morfológicamente y es necesario el uso de análisis de filogenéticos para detectar las diversas especies crípticas dentro de este complejo. Además de que los caracteres morfológicos de las especies de *Colletotrichum* varían bajo diferentes condiciones de incubación (medios de cultivo, luz y temperatura) o por el continuo proceso de transferencias y obtención de subcultivos (Cannon *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2009; Damm *et al.*, 2012b). Por lo que la forma y tamaño de los conidios, así como los caracteres de las colonias, deben evaluarse y usarse con precaución, ya que estos son altamente dependientes de las condiciones de crecimiento (Cai *et al.*, 2009).

En este estudio, ninguno de los aislados presentó características típicas de aislados pertenecientes a los complejos *C. acutatum* y *C. boninense*. Esto es importante, ya que diversos estudios basados en la combinación de caracterización morfológica y análisis de secuencias han indicado que *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense* son los complejos de especies que se encuentran asociados a tejidos de mango, siendo *C. gloeosporioides* el complejo más comúnmente encontrado a nivel mundial (Lima *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2014; Honger *et al.* 2014). Estos complejos pueden distinguirse morfológicamente mediante caracterización de forma y tamaño de los conidios. En el caso de los aislados del complejo *C. gloeosporioides*, estos producen conidios cilíndricos. Las especies del complejo *C. boninense* presentan conidios similares a los del complejo *C. gloeosporioides*, pero con un hilo (cicatriz) prominente en la base del conidio (Damm *et al.*, 2012a). Mientras que las especies dentro del complejo *C. acutatum* generalmente forman conidios fusiformes con uno o ambos extremos

agudos (Phoulivong *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2012b). Asimismo, se ha reportado que los caracteres morfológicos y de las colonias, solo son útiles para discriminar a nivel de complejos de *Colletotrichum*, pero no sirven para determinar a nivel de especie dentro de estos (Damm *et al.*, 2010; Cannon *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012).

Análisis filogenético

El árbol filogenético generado en este estudio con 65 secuencias *Apn2*/Mat IGS, proveyó suficiente información para distinguir las especies de *Colletotrichum* de 38 aislados obtenidos de tejidos de mango con síntomas de antracnosis (Figura 6). Se identificó a 23 aislados como *C. dianesei*, 9 como *C. asianum*, 4 como *C. tropicale* y 2 como *C. fructicola*.

Colletotrichum dianesei fue la especie encontrada con mayor frecuencia (60%) en México según el análisis de secuencias *Apn2*/MAT IGS. Asimismo, no se observó preferencia de esta especie con algún tejido, cultivar o sitio de colecta, debido a que *C. dianesei* se obtuvo a partir de hojas y frutos de mango, así como de diversos cultivares (Ataulfo, Haden, Kent, Keitt, Manila y Tommy Atkins) y sitios de colecta de los principales estados productores de México (Chiapas, Colima, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz). Además, no fue posible inferir su especificidad a tejidos y cultivares de mango, debido a que el número de aislados analizados fue pequeño. Esta misma situación se reportó en los estudios realizados por Lima *et al.* (2013) y Vieira *et al.* (2014), para el caso de aislados de especies de *Colletotrichum* identificadas en tejidos de mangos de la región nordeste de Brasil. Por otra parte, también se ha reportado que *C. dianesei* causa la antracnosis del mango en la India (Sharma *et al.*, 2014).

Colletotrichum asianum fue la segunda especie encontrada con mayor prevalencia (23.6%) en este estudio. Esta se detectó en aislados provenientes de los estados de Chiapas, Michoacán, Veracruz y Nayarit. En este mismo sentido, Honger *et al.* (2014) registraron, recientemente, la presencia de *C. asianum* asociada a síntomas de frutos de mango a provenientes de México. De manera similar, Lima *et al.* (2013) y Vieira *et al.* (2014) señalaron que *C. asianum* fue la segunda especie más frecuentemente aislada en sus estudios, realizados con especies de *Colletotrichum* obtenidas de tejidos de mango, en Brasil. Otros países en los que se ha reportado la presencia de *C. asianum* asociada a mango son Australia, Filipinas, Panamá (Weir *et al.*, 2012), Tailandia (Phoulivong *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012), India (Sharma *et al.*, 2013) y Ghana (Honger *et al.*, 2014), colocando a esta especie como la más ampliamente distribuida en los principales países productores de mango.

Colletotrichum tropicale se detectó en 10.5% de los aislados identificados en este estudio, mediante análisis de secuencias *Apn2/MAT* IGS. Esto coincidió con los estudios publicados por Lima *et al.* (2013) y Vieira *et al.* (2014), quienes reportaron a *C. tropicale* con porcentajes de prevalencia menores que *C. dianesei* y *C. asianum*, en tejidos de mango.

Colletotrichum fructicola se identificó únicamente en 5.2% del total de los aislados analizados molecularmente. De manera similar, esta especie se reportó en Brasil (Lima *et al.*, 2013) e India (Sharma *et al.*, 2013), causando la antracnosis del mango, mientras que Vieira *et al.* (2014) reportaron a este hongo como un endófito de tejidos de mango en el nordeste de Brasil.

Prueba de patogenicidad

Seis días de después de la inoculación, todos los frutos inoculados desarrollaron lesiones necróticas hundidas en el pericarpio, mientras que los frutos testigo permanecieron libres de la enfermedad (Figura 7), lo que confirmó la patogenicidad de los 100 aislados de *Colletotrichum*.

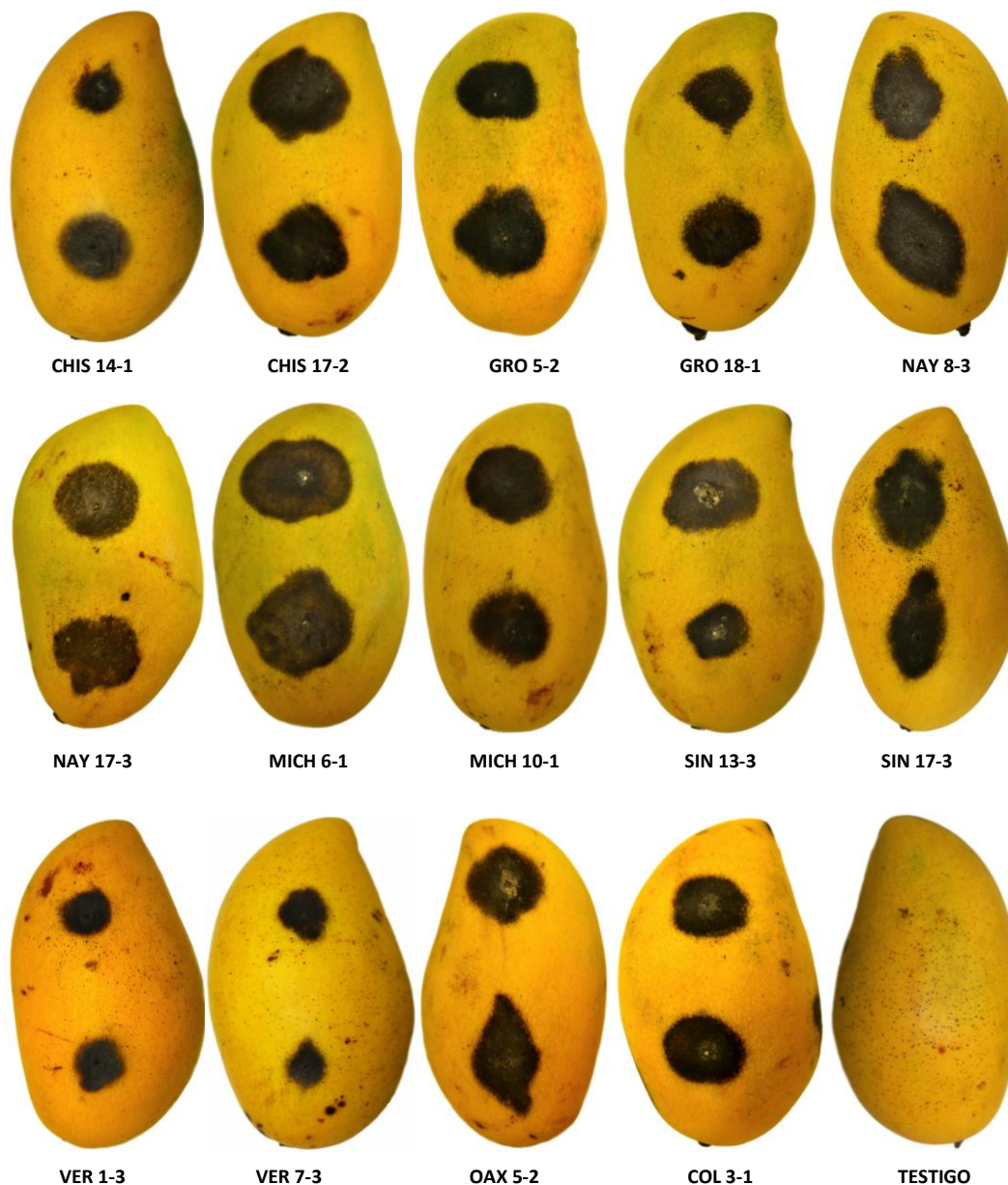


Figura 7. Lesiones necróticas y hundidas típicas de antracnosis en frutos de mango cv. Manila, resultado de la prueba de patogenicidad de diferentes aislados de *Colletotrichum* spp. a 6 días después de la inoculación artificial con una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^5 esporas mL^{-1} .

Los resultados de las pruebas de patogenicidad confirmaron que *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola* son las especies responsables de causar la antracnosis del mango en México. Lo anterior demuestra la amplia diversidad de especies de *Colletotrichum* que se pueden encontrar causando esta enfermedad en un solo país, como se registró en Brasil (Lima *et al.*, 2013) e India (Sharma *et al.*, 2013).

En este trabajo no se estimó la virulencia de aislados de las diferentes especies de *Colletotrichum* causantes de la antracnosis del mango en México, dado que los síntomas desarrollados en frutos de mango pueden variar considerablemente, de acuerdo con distintos factores como cultivar, condición del fruto, humedad y temperatura, así como concentración de inóculo (Freeman *et al.*, 1998; Sanders y Korsten, 2003; Giblin *et al.*, 2010). Por lo que se sugiere la realización de investigaciones posteriores, con la finalidad de determinar el potencial de virulencia de las especies de *Colletotrichum*, de acuerdo con datos generados con infecciones naturales en lugar de infecciones artificiales, como lo mencionaron Prihastuti *et al.* (2009) Lima *et al.* (2013) y Viera *et al.* (2014). Asimismo, es necesario evaluar la respuesta a la infección por *Colletotrichum* spp. en los principales cultivares de mango que se producen en México, con la finalidad de determinar cuáles son los cultivares que presentan tolerancia a esta enfermedad, bajo los diferentes ambientes en los que se desarrolla este frutal.

Finalmente, este estudio tiene amplia relevancia en diversos aspectos relacionados con la enfermedad ocasionada por *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola* en tejidos de mango en México, dado que la identificación apropiada de las especies de *Colletotrichum* es importante para la toma de decisiones cuarentenarias y en la búsqueda de fuentes genéticas de resistencia a este hongo fitopatógeno. Asimismo, la detección exacta del patógeno es crucial para entender la epidemiología y las estrategias que se plantearan para el manejo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

La caracterización morfológica y cultural indicó que todos los aislados obtenidos de tejidos de mango con síntomas de antracnosis pertenecen al complejo de especies de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sin embargo, los caracteres morfológicos de las estructuras de reproducción asexual y de las colonias no fueron útiles para discriminar a nivel de especie en este complejo.

El análisis filogenético generado con las secuencias *Apn2*/MAT IGS de 38 aislados, reveló que *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola* son las especies asociadas a los síntomas de esta enfermedad. Asimismo, las especies *C. dianesei*, *C. tropicale* y *C. fructicola* identificadas en este estudio, se reportan por primera vez en asociación con síntomas de antracnosis en tejidos de mango en México.

La pruebas de patogenicidad confirmaron que *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola* son las especies responsables de causar la antracnosis del mango en México.

LITERATURA CITADA

- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., and Freeman, S. 2003. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93: 579-587.
- Archibald, J. K., Mort, M. E., and Crawford, D. J. 2003. Bayesian inference of phylogeny: a non-technical primer. *Taxon* 52: 187-191.
- Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84: 600-611.
- Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Waller, J., Abang, M. M., Zhang, J. Z., Yang Y. L., Phoulivong, S., Liu, Z. Y., Prihastuti, H., Shivas, R. G., McKenzie, E. H. C., and

- Johnston, P. R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39: 183-204.
- Cannon, P. F., Bridge, P. D., and Monte, E. 2000. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host Pathogen Interaction*. Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M. B. (eds.). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp 1-20.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., and Weir, B. S. 2012. *Colletotrichum*- Current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181-213.
- Damm, U., Baroncelli, R., Cai, L., Kubo, Y., O'Connell, R., Weir, B., Yoshino, K., and Cannon, P. F. 2010. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. *IMA Fungus* 1: 161-165.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., Johnston, P. R., Weir, B. S., Tan, Y. P., Shivas, R. G., and Crous, P. W. 2012a. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1-36.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., and Crous, P. W. 2012b. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37-113.
- Davis, M. J. 1999. Genetic and pathological diversity of the mango anthracnose pathogen in Florida. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society* 112:197-200.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Doyle, V. P., Oudemans, P. V., Rehner, S.A., and Litt, A. 2013. Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. from wild and agricultural landscapes in North America. *PLoS One* 8: e62394
- Estrada, A. B., Dodd, J. C., and Jeffries, P. 2000. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* 49: 608-618.

- FAOSTAT, 2010. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/S>
- Fitzell, R. D., and Peak, C. M. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. *Annals of Applied Biology* 104: 53-59.
- Giblin, F. R., Coates, L. M., and Irwin, J. A. G. 2010. Pathogenic diversity of avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose and pepper spot. *Australasian Plant Pathology* 39: 50-62.
- Goh, T. K. 1999. Single-spore isolation using a handmade glass needle. *Fungal Diversity* 2: 47-63.
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Vaquera-Huerta, H., Martínez-Damián, T. y Delgadillo-Sánchez, F. 2001. Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 90-93.
- Honger, J. O., Offei, S. K., Oduro, K. A., Odamtten, G. T., and Nyaku, S. T. 2014. Identification and species status of the mango biotype of *Colletotrichum gloeosporioides* in Ghana. *European Journal of Plant Pathology* 140: 455-467.
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., and Prihastuti, H. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39: 1-17.
- Hyde, K. D., Cai, L., Cannon, P. F., Crouch, J. A., Crous, P. W., Damm, U., Goodwin, P. H., Chen, H., Johnston, P. R., Jones, E. B. G., Liu, Z. Y., McKenzie, E. H. C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S. R., Pfenning, L. H., Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., and Chukeatirote, E. 2009b. *Colletotrichum*- names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.

- James, R. S., Ray, J., Tan, Y. P., and Shivas, R. G. 2014. *Colletotrichum siamense*, *C. theobromicola* and *C. queenslandicum* from several plant species and the identification of *C. asianum* in the Northern Territory, Australia. Australasian Plant Disease Notes. DOI 01.1007/s13314-014-0138-x
- Johnson, G. I., and P. J. Hofman. 2009. Postharvest technology and quarantine treatments. *In*: Litz, R. E (ed.) The Mango: Botany, Production and Uses. CABI Publishing. London, UK. pp: 529-605.
- Lima, N. B., Batista, M. V. A., Morais, M. A. Jr., Barbosa, M. A. G., Michereff, S. J., Hyde, K. D., and Câmara M. P. S. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. Fungal Diversity 61:75-88.
- Mukherjee, S. K., and Litz, R. E. 2009. Introduction: Botany and importance. *In*: Litz, R. E (ed.) The Mango: Botany, Production and Uses. CABI Publishing. London, UK. pp: 1-18.
- Martínez, E. P., Hío, J. C., Osorio, J.A., and Torres, M. F. 2009. Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. Agronomía Colombiana 27: 211-218.
- Paull, R. E., and Duarte, O. 2011. Tropical Fruits. Second edition. Volume 1. CABI Publishing. London, UK. 400 p.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. Fungal Diversity 44:33-43.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution 25: 1253–1256

- Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., and Hyde, K. D. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39: 89-109.
- Ploetz, R. C. 1994. Anthracnose. *In: Compendium of Tropical Fruit Diseases*. Ploetz, R. C., Zentmyer, G. A., Nishijima, W. T., Rohrbach, K. G. and Ohr, H. D. (eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 35-36 pp.
- Ploetz, R. C. 2003. Diseases of mango. *In: Diseases of Tropical Fruit Crops*. Ploetz, R. C (ed.) CABI Publishing. London, UK. pp. 327–363.
- Ploetz, R. C., and Freeman, S. 2009. Foliar, floral, and soilborne diseases. *In: Litz, R. E (ed.) The Mango: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing. London, UK. pp: 231-302.
- Prusky, D., Kobilier, I., Miyara, I., and Alkan, N. 2009. Fruit Diseases. *In: Litz, R. E (ed.) The Mango: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing. London, UK. pp: 210-230.
- Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R. G., Tan, Y. P, Taylor, P. W. J., Weir, B. S., Yang, Y. L., and Zhang, J. Z. 2009. *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.
- Rambaut, A., and Drummond, A. J. 2007. Tracer v1.4. Disponible en: <http://beast.bio.uk/Tracer>
- Rivera-Vargas, L. I., Lugo-Noel, Y., McGovern, R. J., Seijo, T., and David, M. J. 2006. Occurrence and distribution of *Colletotrichum* spp. on mango (*Mangifera indica* L.) in Puerto Rico and Florida, USA. *Plant Pathology Journal* 5: 191-198.
- Rojas, E. I., Rehner, S. A., Samuels, G. J., Van Bael, S. A., Herre, E. A., Cannon, P., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y., Peng, Y, Q., and Sha, T. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s. l. associated with *Theobroma cacao* and others plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102: 1318-1338.

- Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Nieto-Ángel, D., and Acosta-Ramos, M. 2008. Virulence and genetic variation of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. on mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 21-26.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., and Huelsenbeck, J. P. 2012. MrBayes v. 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Sanders, G. M., and Korsten, L. 2003. Comparison of cross inoculation potential of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological Research* 158: 143-150.
- Serra, I. M. R. S., Coelho, R. S. B., Ferraz, G. M. G., Montarroyos, A. V. V., e Silva, D. S. 2011. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal da antracnose em mangueira, e identificação de espécie. *Summa Phytopathologica* 37(1): 42-51.
- Sharma, G., Kumar, N., Weir, B. S., Hyde, K. D., and Shenoy, B. D. 2013. The *ApMat* marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Diversity* 61: 117-138.
- Sharma, G., Kumar, N., and Shenoy, B. D. 2014. Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using *ApMat* marker. *Fungal Diversity* DOI 10.1007/s13225-014-0312-7.
- SIAP (Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera). 2013. Disponible en www.siap.sagarpa.gob.mx (Consultado en Febrero 2014).

- Staden, R., Beal, K. F., and Bonfield, J. K. 1998. The Staden package, 1998. *In*: Misener, S. and Krawetz, S. A. (eds.) *Bioinformatics methods and protocols*. Humana, New York, USA. pp 115–130.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., and Nei, M. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Udayanga, D., Manamgoda, D. S., Liu, X., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits?. *Fungal Diversity* 61:165-179.
- Vieira, W. A. S., Michereff, S. J., de Moraes, Jr. M. A., Hyde, K. D., and Câmara, M. P. S. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 67: 181-202.
- Weir, B. S., Johnston, P.R., and Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.
- Weng, F. Y., and Chuang, T. Y. 1995. Grouping of mango anthracnose fungus in Taiwan. *Plant Protection Bulletin* 37: 295-309.
- Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S., and Diamantopoulou, P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia Microbiologica* 46: 231-234

CAPÍTULO II

SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS MBC Y SENSIBILIDAD BASE A PROCLORAZ EN ESPECIES DEL COMPLEJO *Colletotrichum gloeosporioides* CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL MANGO EN MÉXICO

RESUMEN

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad pre- y postcosecha más importante del mango a nivel mundial y se controla principalmente mediante, el uso de fungicidas sistémicos pertenecientes a la clase metil-benzimidazol-carbamatos (MBC). En México, esta enfermedad es causada por *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola*, los cuales pertenecen al complejo de especies *C. gloeosporioides*. En este estudio, se determinó la sensibilidad a fungicidas MBC (benomil y carbendazim) y se estimó la sensibilidad base al procloraz, en 100 aislados de especies del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* colectados en huertos comerciales de mango en los mayores estados productores de México. Todos los aislados de *Colletotrichum* se consideraron como población con sensibilidad base a los fungicidas de la clase DMI (inhibidores de la demetilación), debido a que estos se colectaron en huertos de mango que no habían sido expuestos a aplicaciones de procloraz, o cualquier otro fungicida de esta clase. Los aislados se evaluaron usando una prueba *in vitro* para determinar la concentración efectiva del fungicida a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para cada combinación de aislado-fungicida. Los aislados presentaron valores de CE_{50} de benomil que variaron de 0.1123 a 0.3543 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 0.2184 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Mientras que, los valores de CE_{50} para carbendazim variaron de 0.0880 a 0.1792 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 0.1409 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Los valores CE_{50} de sensibilidad base al procloraz variaron de 0.0048 a 0.0851 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 0.0331 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Nuestros resultados revelaron la presencia en México de aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* de mango sensibles a fungicidas MBC. Los datos determinados este estudio servirán para monitorear variaciones posteriores en la sensibilidad de poblaciones de *Colletotrichum* de mango a fungicidas MBC y DMI.

Palabras clave: *Colletotrichum* spp., *Mangifera indica*, sensibilidad, fungicidas.

CHAPTER II

SENSITIVITY TO MBC FUNGICIDES AND BASELINE SENSITIVITY TO PROCHLORAZ IN SPECIES OF *Colletotrichum gloeosporioides* COMPLEX CAUSING MANGO ANTHRACNOSE IN MEXICO

ABSTRACT

Anthracnose, caused by *Colletotrichum* spp., is the most important pre- and postharvest disease of mango worldwide and is controlled primarily by systemic fungicides belonging to methyl benzimidazole carbamate (MBC) class. In México, this disease is caused by *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* and *C. ignotum*. In this study, 100 isolates of species of *Colletotrichum gloeosporioides* complex collected in 2010-2013 from 100 commercial orchards in the major mango growing states of Mexico were screened for sensitivity to MBC fungicides (benomyl and carbendazim) and tested to determine their baseline sensitivity to prochloraz. All isolates were collected from orchards with a history of benomyl sprays. Whereas, due to all the *Colletotrichum* isolates were collected from mango orchards that had not been exposed to prochloraz, or any other DMI fungicide. Thus, these isolates were considered baseline populations to this fungicide class. All Isolates were tested using an *in vitro* assay to determine the effective fungicide concentration at which 50% of mycelial growth was inhibited (EC_{50}) for each isolate-fungicide combination. EC_{50} values ranged from 0.1123 to 0.3543 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean = 0.2184 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for benomyl and from 0.0880 to 0.1792 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean = 0.1409 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for carbendazim. Baseline EC_{50} values of prochloraz ranged from 0.0048 to 0.0851 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean = 0.0331 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Our results revealed the existence in Mexico of isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* complex from mango highly sensitive to MBC fungicides. The data obtained here will serve to monitor future variations in sensitivities of *Colletotrichum* populations from mango to MBC and DMI fungicides.

Key words: *Colletotrichum* spp., *Mangifera indica*, sensitivity, fungicide.

INTRODUCCIÓN

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad pre- y postcosecha más importante del mango a nivel mundial (Ploetz 2003; Paull y Duarte, 2011). La incidencia de esta enfermedad puede llegar a 100% en fruta producida en condiciones de alta humedad (Arauz, 2000; Prusky *et al.*, 2009). En México, la antracnosis del mango es causada por *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. ignotum*, las cuales pertenecen al complejo de especies *C. gloeosporioides* (Tovar-Pedraza, 2014). Entre las herramientas básicas para el manejo de la antracnosis del mango, en condiciones de campo, se encuentran los fungicidas sistémicos pertenecientes a la clase metil-benzimidazol-carbamatos (MBC), así como fungicidas de contacto de la clase de los ditiocarbamatos y derivados de cobre (McMillan, 1984; Ploetz *et al.*, 2003; Akem, 2006; Prusky *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2012).

Los fungicidas sistémicos pertenecientes a la clase MBC están representados principalmente por benomil, carbendazim, tiabendazol y tiofanato-metil. El modo de acción de estos fungicidas se basa en inhibir la producción de microtúbulos mediante su unión a las subunidades heterodiméricas de la molécula tubulina (Peres *et al.*, 2004). La resistencia a fungicidas MBC se asocia a cambios en la secuencia de aminoácidos ocasionados por mutaciones en los codones 6, 50, 167, 198, 200 y 240 del gen *B-tubulina* (Ma y Michailides, 2005). Existen diversos reportes de hongos fitopatógenos que se han encontrado como resistentes a fungicidas MBC. En el caso de aislados de *Colletotrichum* spp. de mango, el control de la antracnosis ha sido irregular en algunos huertos comerciales en donde se han aplicado continuamente fungicidas MBC, debido a la expresión de resistencia por parte del patógeno, como se reportó en EE.UU. (Spalding, 1982), Tailandia (Farungsang y Farungsang, 1992; Nalumpang *et al.*, 2010; Kongtragoul *et al.*, 2011), Sudáfrica (Sanders *et al.*, 2000), India (Kumar *et al.*, 2007) y China (Xu *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013).

Por otra parte, el procloraz es un fungicida DMI-imidazol, sistémico local con actividad erradicante y su modo de acción se basa en la inhibición de la ruta de la biosíntesis del ergosterol (Ma y Michailides, 2005). Este fungicida se ha usado como un protectante o erradicante (Estrada *et al.*, 1996), además de usarse en combinación con agua caliente como un tratamiento postcosecha en frutos de mango con destino final a países de la Unión Europea (Arauz, 2000; Oosthuysen, 2000; Dang *et al.*, 2008; Prusky *et al.*, 2009; Swart *et al.*, 2009). Según Arauz (2000), la efectividad de este fungicida bajo condiciones de campo puede variar de 65 a 94%, con una alta y moderada presión de la enfermedad, respectivamente. En Taiwán, la frecuencia de aplicaciones de procloraz por ciclo varía de 1 a 16, dependiendo de la incidencia de la enfermedad (Kuo, 2001). En contraste, en México los fungicidas DMI prácticamente no se usan para el control de esta enfermedad en campo.

En México, la mayoría de los productores de mango realizan aplicaciones continuas de fungicidas de contacto a base de cobre (oxicloruro de cobre o hidróxido cúprico) durante el periodo de lluvias, para el control de la antracnosis. Pocos agricultores realizan aplicaciones de fungicidas con acción sistémica de la clase MBC, entre 1 a 3 aplicaciones por año, en contraste con el elevado número de aplicaciones de esta clase de fungicidas en otros países productores, como EE.UU. (McMillan, 1984), Australia (Fitzell, 1981), India (Kumar *et al.*, 2007) y China (Xu *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008).

Para la investigación y manejo de resistencia a fungicidas, la línea base de la sensibilidad puede definirse como un perfil de la sensibilidad del hongo objetivo a un fungicida, construido mediante el uso de técnicas biológicas o de biología molecular, para evaluar la respuesta de individuos o poblaciones fúngicas que no se han expuesto a fungicidas de una determinada clase química. En la práctica, la línea base establece un punto de referencia para aceptar la sensibilidad de un hongo a un fungicida. Aislados o poblaciones fúngicas que se encuentran con un perfil de

sensibilidad que cae fuera de la repuesta de la línea base normalmente se consideran como menos sensibles o resistentes al fungicida (Russell, 2004). Asimismo, la determinación de la sensibilidad base es el paso inicial en el establecimiento de programas de monitoreo de la resistencia a fungicidas para detectar cambios en la sensibilidad de hongos, así como para evaluar el impacto de su uso en la producción del cultivo (Brent, 1992).

En México no existen estudios publicados enfocados a determinar la distribución de la sensibilidad a fungicidas MBC en especies de *Colletotrichum* aislados de mango. En la actualidad, es necesario conocer la sensibilidad de estas especies asociadas a la antracnosis del mango, para definir estrategias de aplicación en pre- y postcosecha para el manejo de la enfermedad. Los objetivos de este estudio fueron: i) determinar la distribución de la sensibilidad a benomil y carbendazim, en poblaciones de *Colletotrichum* spp. aisladas de mango y ii) determinar la línea base de la sensibilidad al fungicida procloraz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen y colección de aislados de *Colletotrichum* spp.

Los 100 aislados de especies del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* (*C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. ignotum*) usados en este estudio se identificaron previamente, mediante caracterización morfológica, pruebas de patogenicidad y análisis de secuencias *Apn2Mat* IGS, como causantes de la antracnosis del mango en México (Tovar-Pedraza, 2014). Estos aislados se obtuvieron a partir tejidos sintomáticos de mango y se recolectaron en 100 huertos comerciales distribuidos en los principales estados productores en México, durante muestreos realizados de 2010 a 2013 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Origen geográfico, año de colecta y número de aislados del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos de mango, para determinar la sensibilidad *in vitro* a benomil, carbendazim y procloraz.

Origen geográfico	Clave de aislados	Año de colecta	Número de aislados
Chiapas	CHIS	2010	19
Nayarit	NAY	2012	16
Sinaloa	SIN	2012	15
Veracruz	VER	2011	12
Michoacán	MICH	2011	10
Guerrero	GRO	2011	10
Oaxaca	OAX	2012	8
Colima	COL	2012	5
Campeche	CAM	2013	3
Tabasco	TAB	2013	2

Todos los 100 aislados se obtuvieron a partir de huertos con historial de aplicación del fungicida benomil. Asimismo, debido a que todos los aislados usados en este estudio se colectaron en huertos de mango que no habían recibido a aspersiones con procloraz, o cualquier otro fungicida DMI, estos aislados se consideraron como poblaciones con sensibilidad base a esta clase de fungicidas.

Los aislados se mantuvieron como suspensión de esporas y discos miceliales en glicerol al 20% y bajo temperatura de -80 °C para largo almacenamiento; Para almacenamiento a corto tiempo, se almacenaron en agua destilada estéril a 4 °C. Subcultivos frescos se obtuvieron mediante transferencia de discos miceliales a cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA; Difco[®], Francia).

Fungicidas

En este estudio se utilizaron formulaciones comerciales de benomil (Benomil[®], DUPONT), carbendazim (Bavistin[®], BASF) y procloraz (Sportak[®], BAYER CROPSCIENCE). Las concentraciones evaluadas de los fungicidas se basaron en el ingrediente activo.

Sensibilidad de *Colletotrichum* spp. al benomil

La sensibilidad al benomil se determinó con base en ensayos de inhibición del crecimiento micelial de 100 aislados. Se preparó una suspensión madre de benomil con agua destilada estéril y se agregó al medio de cultivo PDA, después de la esterilización, para obtener las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, y 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cajas Petri con medio PDA sin fungicida sirvieron como testigo. Todas las cajas con medio PDA con fungicida se prepararon 24 h antes de usarlas en la prueba y se mantuvieron en oscuridad continua a 10°C. Del margen con crecimiento activo de una colonia de 5 días de edad se tomaron discos miceliales de 5 mm de diámetro y se colocaron en el centro de las cajas Petri con medio PDA y benomil a cada una de las concentraciones señaladas anteriormente. Las cajas se incubaron durante 6 días a 28°C en oscuridad continua. Para cada aislado, se usaron tres repeticiones por concentración. El diámetro de la colonia de cada caja Petri se midió perpendicularmente en dos direcciones y se promedió. El diámetro del disco de agar (5 mm de diámetro) se restó del diámetro de la colonia, antes de realizar el análisis de datos. El experimento completo se realizó dos veces.

Para cada aislado, la concentración efectiva que inhibe 50% del crecimiento micelial (CE₅₀) se calculó mediante una regresión lineal del porcentaje de inhibición relacionado con el crecimiento micelial del testigo contra la transformación del log₁₀, para cada una de las siete concentraciones de benomil, usando PROC REG de SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1.3 SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.). El promedio de los valores de CE₅₀ de los dos

experimentos para cada aislado, se usó en el análisis de datos y se verificó que no hubiera diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ambos experimentos.

Sensibilidad cruzada entre fungicidas MBC

Veinticinco aislados de *Colletotrichum* spp. se seleccionaron aleatoriamente para determinar la sensibilidad a carbendazim, usando la prueba de inhibición del crecimiento micelial descrita para el benomil. La determinación de la sensibilidad cruzada entre el benomil y el carbendazim se realizó con un análisis de correlación Pearson, entre los valores de CE_{50} de ambos fungicidas, usando PROC CORR de SAS ($P = 0.05$). Previamente, se realizó una prueba de normalidad, a fin de cumplir con los supuestos estadísticos.

Determinación de la sensibilidad base al procloraz

Para determinar la línea base de la sensibilidad de aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* al procloraz, todos los aislados se precultivaron en cajas Petri con PDA bajo condiciones de oscuridad continua, a 28 °C durante 5 días. Después, el volumen apropiado de una solución madre de procloraz se añadió antes de la solidificación a medio de cultivo PDA esterilizado, para obtener concentraciones finales de 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los valores de CE_{50} se determinaron como ya se describió para el caso de fungicidas MBC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de la sensibilidad a benomil

Los 100 aislados de *Colletotrichum* spp. aislados de tejidos de mango presentaron valores de CE₅₀ de benomil que variaron de 0.1123 a 0.3543 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 0.2184 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Es importante resaltar que 95% de los aislados mostraron valores de CE₅₀ de 0.151 a 0.300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 0.2162 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 1).

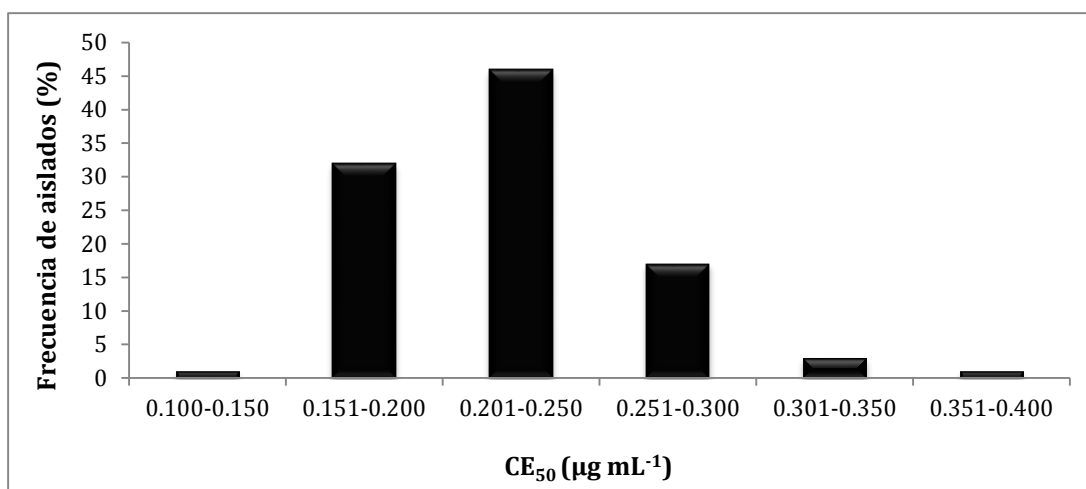


Figura 1. Distribución de frecuencia de valores de concentración efectiva de benomil a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE₅₀) para 100 aislados de especies del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos en huertos comerciales de mango en México.

En este estudio, el crecimiento de ningún aislado fue significativo cuando se usó la máxima concentración de benomil (2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), lo cual indicó una alta sensibilidad a fungicidas MBC en aislados de especies del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos de mango en México. Estos resultados discrepan mucho de aquellos estudios donde se ha usado una concentración de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como discriminatoria para diferenciar aislados sensibles y resistentes a fungicidas MBC en poblaciones de *C. gloeosporioides* (Maymon *et al.*, 2006; Peres *et al.* 2004; Narkar *et al.*, 2012) y *C. cereale* (Wong *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2010).

Los valores de sensibilidad mostrados en la Figura 1 indicaron que ninguno de los 100 aislados evaluados en este estudio fue resistente al benomil, debido a que Zhang *et al.* (2013), consideraron como población sensible, resistente y altamente resistente a los aislados *Colletotrichum gloeosporioides* obtenidos de mango que presentaban valores de CE₅₀ de 0.11-0.66, 1.12-105.79 y 1490-11727 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para el caso de fungicidas MBC.

La presencia en México de aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* sensibles a benomil puede deberse a que en la mayoría de los huertos comerciales de mango, el número de aplicaciones de fungicidas MBC por año varía de uno a tres, mientras que en países como EE.UU. (Spalding, 1982; McMillan, 1984), Australia (Fitzell, 1981) e India, se ha reportado resistencia a esta clase de fungicidas probablemente debido a que se realizan más de 15 aplicaciones por año.

En este sentido, Gutiérrez-Alonso *et al.* (2003a) llevaron a cabo una prueba de inhibición del crecimiento micelial con seis aislados de *C. gloeosporioides* provenientes de cinco estados de México (Guerrero, Michoacán, Veracruz, Sinaloa y Chiapas), determinando valores mínimos de CE₅₀ para benomil de 2.4 y 18.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para el caso de aislados de Guerrero y Chiapas, respectivamente. En contraste, nuestros resultados indican valores máximos estimados de CE₅₀ = 0.3543 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Es importante resaltar que la diferencia en los valores de CE₅₀ entre ambos estudios pudo fluctuar debido a que, en el trabajo de Gutiérrez-Alonso *et al.* (2003a), las cajas Petri se incubaron bajo luz fluorescente continua durante el ensayo de inhibición del crecimiento micelial, lo cual pudo haber ocasionado una rápida degradación del ingrediente activo en el medio de cultivo, como lo señalaron Escalada *et al.* (2006) y Yoursef y Akasheh (2011), para el caso de diferentes fungicidas benzimidazoles sensibles a la fotodegradación en condiciones *in vitro*.

Sensibilidad cruzada entre fungicidas MBC

El análisis de correlación ($r = 0.3532$) indicó que no existe sensibilidad cruzada a los fungicidas benomil y carbendazim en los aislados de especies pertenecientes al complejo *C. gloeosporioides* causantes de la antracnosis del mango en México. Lo anterior contrasta con los resultados del estudio de Zhang *et al.* (2013), en el cual se reportó resistencia cruzada entre los fungicidas carbendazim, thiabendazol y tiofanato-metil, en ocho aislados de *C. gloeosporioides* de mango, en China.

Los valores de CE_{50} para carbendazim en los 25 aislados de especies del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* analizados en este estudio, variaron de 0.087 a 0.205 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 0.1409 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 2). Esto coincidió con lo indicado por Zhang *et al.* (2013), quienes reportaron valores de CE_{50} de 0.11 a 0.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en aislados de *C. gloeosporioides* de mango, de China, sensibles carbendazim. De igual manera, Zhan *et al.* (2005) y Zhan y Huang (2007) describieron poblaciones silvestres de *C. gloeosporioides* de China, con valores de CE_{50} para carbendazim de 0.110 a 0.130 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

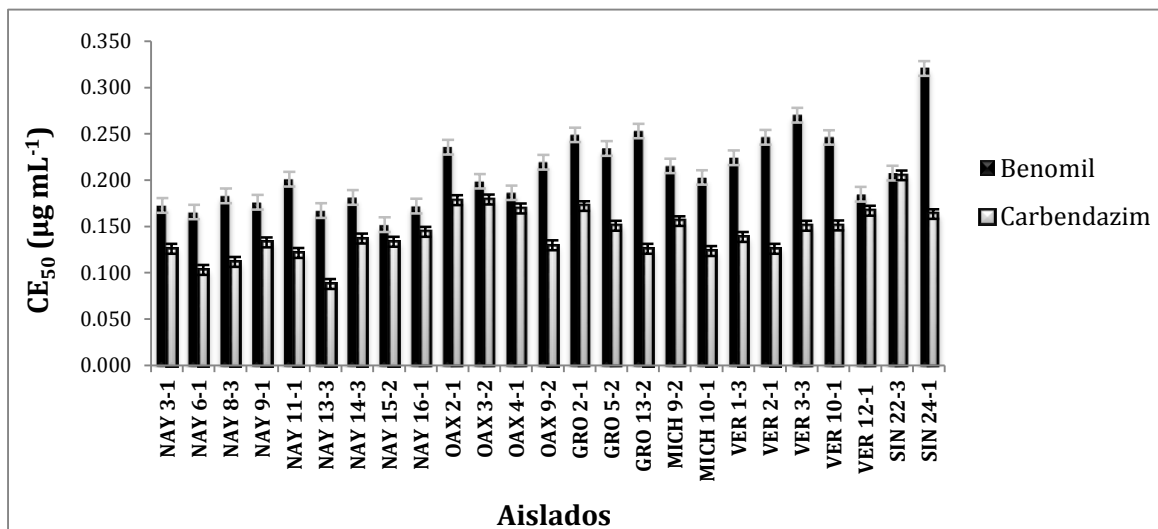


Figura 2. Valores de concentración efectiva para fungicidas MBC (benomil y carbendazim) a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 25 aislados de especies del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos en huertos comerciales de mango, en México.

Los resultados de sensibilidad a carbendazim estimados en esta investigación, indican que los aislados del complejo de *C. gloeosporioides* de México, fueron altamente sensibles a carbendazim y no presentaron resistencia a fungicidas MBC, ya que los valores de CE_{50} fueron $< 1 \mu\text{g mL}^{-1}$, como los determinados para benomil (Figura 2). Similarmente, Zhan *et al.* (2005) y Zhan y Huang (2007) indicaron que los aislados resistentes a MBC son capaces de crecer sin dificultad en medio de cultivo con una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Resultados similares registraron Nalumpang *et al.* (2010) y Kongtragoul *et al.* (2011), quienes mencionaron la presencia de aislados resistentes a carbendazim en poblaciones de *C. gloeosporioides* de mango de Tailandia, los cuales fueron capaz de crecer en medio de cultivo con fungicida, a concentraciones de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Antes de que se desarrollara resistencia al carbendazim en condiciones de campo, este fungicida mostró una efectividad similar o superior a la del benomil en el control de la antracnosis del mango, en países como Malasia (Lim, 1980), India (Jadeja y Vaishnav, 1984; Kumar *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2009), China (Zhan y Huang, 2007), Venezuela (Rivas y Carrizales, 2007), Tailandia (Nalumpang *et al.*, 2010; Kongtragoul *et al.*, 2011) y Pakistán (Hasan *et al.*, 2014). Por lo que este fungicida se puede aplicar en huertos comerciales de mango en México, dentro de un programa de manejo integral de la antracnosis, en condiciones de campo, y así sustituir al fungicida benomil, el cual actualmente está prohibido a nivel mundial. Además, el fungicida carbendazim también puede aplicarse como tratamiento postcosecha en México, ya que ha mostrado excelentes resultados en combinación con agua caliente, en el control de la antracnosis (Dang *et al.*, 2008; Jabbar *et al.*, 2011). Otra ventaja del tratamiento postcosecha con carbendazim se observa en la excelente efectividad que tiene para controlar la pudrición postcosecha del pedúnculo (Swart *et al.*, 2009), causada por diferentes especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae (Marques *et al.*, 2013; Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013).

Sensibilidad base a procloraz

Los valores de CE_{50} determinados en este estudio para el fungicida procloraz, fluctuaron de 0.0048 a 0.0851 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 0.0331 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estos resultados fueron similares a los encontrados por Kuo (2000), quien reportó valores de CE_{50} que variaron de 0.003 a 0.038 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para una población de 55 aislados de *C. gloeosporioides* con sensibilidad base. Este mismo autor registró valores de CE_{50} que variaron de 0.009 a 0.1554 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para aislados que se habían obtenido de huertos comerciales de mango con historial de aplicaciones (1 a 16 por periodo) de procloraz, en Taiwán. De manera similar, Zhang *et al.* (2013) evaluaron 23 fungicidas pertenecientes a diferentes clases químicas y encontraron que el procloraz fue el fungicida más tóxico ($CE_{50} = 0.02\text{-}0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$) para ocho aislados de *C. gloeosporioides* colectados en huertos de mango, de China.

Es importante resaltar, que 87% de los aislados evaluados para sensibilidad al procloraz en este estudio, registraron valores de CE_{50} que fluctuaron entre 0.011 a 0.060 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3).

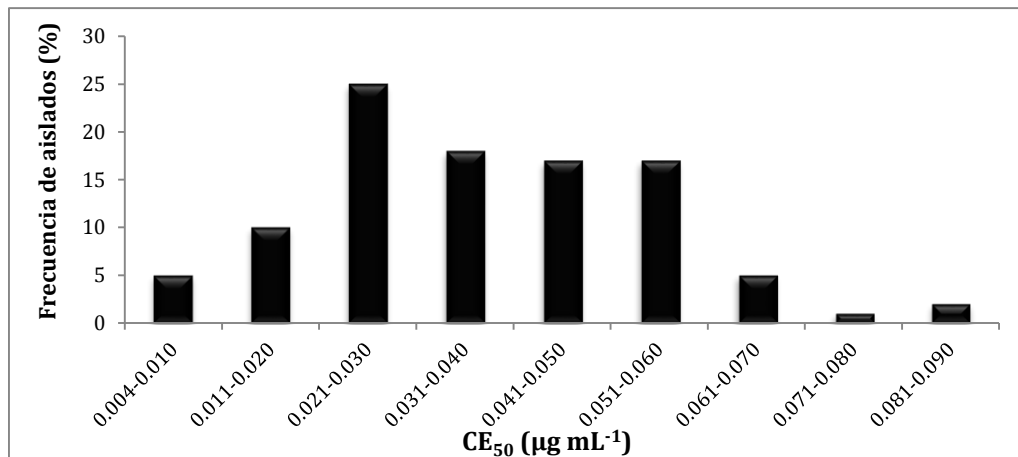


Figura 3. Distribución de frecuencia de valores de concentración efectiva de procloraz a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) de 100 aislados de especies del complejo *C. gloeosporioides* nunca expuestos a aplicaciones de fungicidas DMI en huertos comerciales de mango, en México.

Las pruebas de inhibición del crecimiento micelial de aislados del complejo *C. gloeosporioides* en medio de cultivo PDA combinado con diferentes concentraciones de procloraz, indicaron una alta sensibilidad al fungicida DMI, ya que ningún aislado evaluado en este estudio creció a la concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 4). Estos resultados concuerdan con los de Sanders *et al.* (2000) en Sudáfrica, pues ninguno de sus aislados de *C. gloeosporioides* creció a la concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo cual indicó una alta sensibilidad al procloraz. Resultados similares se reportaron por Rondón *et al.* (2006), quienes encontraron que un aislado de *C. gloeosporioides* obtenido de un huerto de mango en Venezuela mostró 89.6 y 98.6% de inhibición del crecimiento micelial, a concentraciones de procloraz entre 1 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

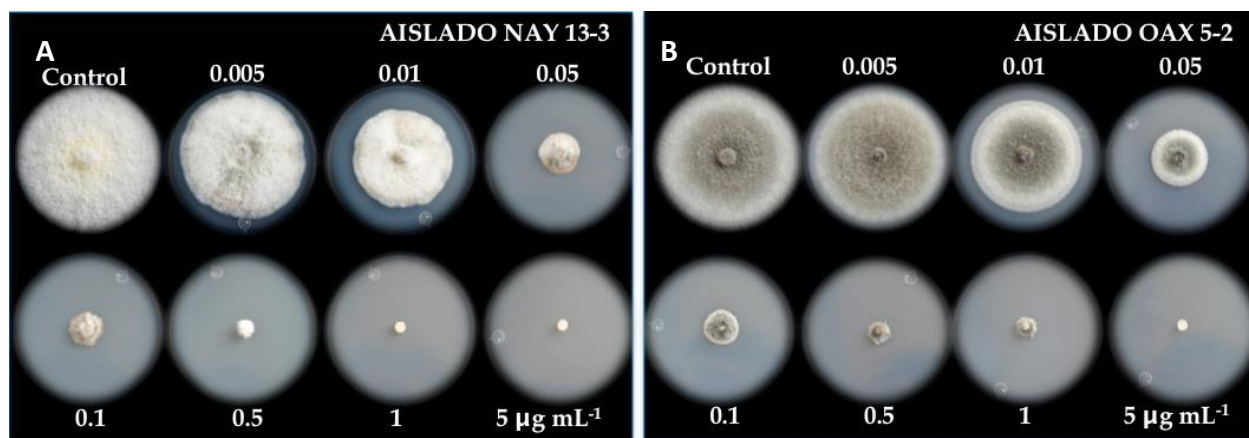


Figura 4. Efecto del fungicida procloraz sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos de huertos comerciales de mango, en México, sin historial de aplicaciones de fungicidas MDI. (A) Aislado colectado en un huerto del estado de Nayarit. (B) Aislado proveniente de un huerto del estado de Oaxaca.

Los datos de sensibilidad base son esenciales para evaluar el riesgo y manejo de la resistencia en campo, así como para monitorear los niveles de resistencia en las poblaciones de hongos fitopatógenos (Chen *et al.*, 2012).

Por otra parte, los valores de sensibilidad base al procloraz de esta investigación fueron más bajos en comparación con los resultados de Wong y Midland (2007), quienes reportaron aislados de *C. cereale* con valores de sensibilidad base de 0.025 a 0.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para el caso de fungicidas DMI. La diferencia puede explicarse dado que se trata de distintas especies de *Colletotrichum*.

En el caso de México, Gutiérrez-Alonso *et al.* (2003b) realizaron una prueba *in vitro* de sensibilidad a procloraz con seis aislados de *C. gloeosporioides* de mango, provenientes de los estados de Veracruz, Guerrero, Michoacán, Sinaloa y Chiapas. En dicho estudio se estimaron valores de CE_{50} que variaron de 0.0803 a 21.48 $\mu\text{g mL}^{-1}$, los cuales fueron muy altos, en comparación con los valores de CE_{50} reportados en este trabajo ($\text{CE}_{50} = 0.0048$ a $0.0851 \mu\text{g mL}^{-1}$). Aunque en los dos estudios se utilizaron aislados de los mismos estados productores de mango en México, la gran diferencia en los valores de sensibilidad puede deberse a que aquí se realizó un ensayo de inhibición del crecimiento micelial, mientras que Gutiérrez-Alonso *et al.* (2003b) realizaron una prueba de efectividad basada en porcentaje de germinación de conidios, siendo que los fungicidas DMI no tienen efecto sobre la germinación conidial.

En países cuyo mercado de exportación es la Unión Europea, el fungicida procloraz se ha usado en combinación con agua caliente como un tratamiento postcosecha efectivo para el control de la antracnosis del mango (Arauz, 2000; Oosthuysen, 2000; Dang *et al.*, 2008; Prusky *et al.*, 2009; Swart *et al.*, 2009; López-Vásquez y Castaño-Zapata, 2010). Además, dicho ingrediente activo también puede aplicarse en condiciones de campo (Fitzel y Peak, 1988; Kuo, 2000; Ray *et al.*, 2009).

Nuestros resultados mostraron que en México se puede utilizar el fungicida imidazol-procloraz para el control efectivo de la antracnosis del mango, tanto en condiciones de campo como en postcosecha, ya que este fungicida presenta excelente actividad en frutos mediante la eliminación de infecciones quiescentes, como lo mencionaron Jhonson y Hofman (2009).

Además de que el riesgo de generar resistencia al procloraz en aislados del complejo *C. gloeosporioides* es muy bajo, como lo demostraron los estudios de Sanders *et al.* (2000) y Kuo (2000). Sin embargo, es importante señalar que el uso de procloraz como tratamiento postcosecha está prohibido para frutos de mango que tienen como mercado a EE.UU., por lo que este tratamiento solo podría usarse para el caso de los frutos con destino a la Unión Europea o países como Australia, Brasil, China, Colombia, Perú y Sudáfrica, en donde el procloraz no tiene restricción (Jhonson y Hofman, 2009).

Recientemente, Monteon-Ojeda *et al.* (2012) encontraron que el fungicida myclobutanil, el cual pertenece a la clase DMI, mostró buena efectividad para el control de la antracnosis del mango en huertos localizados en Guerrero, México. Por lo que nuestros datos de sensibilidad base al procloraz servirán como referencia para el futuro monitoreo de variación en la sensibilidad a fungicidas DMI en poblaciones de aislados del complejo *C. gloeosporioides*, en México.

CONCLUSIONES

La prueba de sensibilidad a fungicidas MBC (benomil y carbendazim) mostró que las especies de *Colletotrichum* responsables de causar la antracnosis del mango son altamente sensibles a esta clase de fungicidas.

Los valores de sensibilidad base al procloraz variaron de 0.0048 a 0.0851 $\mu\text{g mL}^{-1}$, lo que indicó que los aislados evaluados fueron altamente sensibles a este fungicida.

LITERATURA CITADA

- Akem, C. N. 2006. Mango anthracnose disease: Present status and future research priorities. *Plant Pathology Journal* 5: 266-273.
- Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease* 84: 600-611.
- Brent, K. 1992. Monitoring fungicide resistance: purposes, procedures, and progress. *In*: Denholm, E., Debonshire, A.L., Hollomon, D.W. (eds.), *Resistance '91: Achievements and Developments in Combating Pesticide Resistance*. Elsevier Applied Science. London, UK. pp. 1-18.
- Chen, Y., Zhang, A. F., Gao, T. C., Zhang, Y., Wang, W. X., Ding, K. J., Chen, L., Sun, Z., Fang, X. Z., and Zhou, M. G. 2012. Integrated use of pyraclostrobin and epoxiconazole for the control of *Fusarium* head blight of wheat in Anhui Province of China. *Plant Disease* 96: 1495-1500.
- Dang, K. T. H., Singh, Z., and Swinny, E. E. 2008. Impact of postharvest disease control methods and cold storage on volatiles, color development and fruit quality in ripe Kensington Pride mangoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10667-10674.
- Escalada, J. P., Pajares, A., Gianotti, J., Massad, W. A., Berolotti, S., Amat-Guerri, F., and García, A. N. 2006. Dye-sensitized photodegradation of the fungicide carbendazim and related benzimidazoles. *Chemosphere* 65: 237-244.
- Estrada, A. B., Jeffries, P., and Dodd, J. C. 1996. Field evaluation of a predictive model to control anthracnose disease of mango in Phillipines. *Plant Pathology* 45: 294-301.
- Farungsang, U., and Farungsang, N. 1992. Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp. associated with rambutan and mango fruit rot in Thailand. *Acta Horticulturae* 321: 891-897.

- Fitzell, R. D. 1981. Effects of regular applications of benomyl on the population of *Colletotrichum* in mango leaves. Translation of British Mycology Society 77: 529-533.
- Fitzell, R. D., and Peak, C. M. 1981. Management strategies for control of anthracnose and bacterial black spot of mango in Northern New South Wales. Acta Horticulturae 231: 513-517.
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F., y Vaquera-Huerta, H. 2003a. Resistencia a benomil y tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en cinco regiones de México. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 260-266.
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F., y Vaquera-Huerta, H. 2003b. Evaluación de resistencia a imazalil, prochloraz y azoxystrobin en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y control de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 379-383.
- Hasan, N. S. A., Perveen, R., Manzoor, S. A., and Abbas, Z. 2014. Occurance of mango anthracnose on inflorescence in Multan (Punjab) and it's *in vitro* control through various fungicides. International Journal of Biosciences 4(7): 184-191.
- Jabbar, A., Malik, A. U., Saeed, M., Malik, O. H., Amin, M., Khan, A. S., Rajwana, I. A., Saleem, B. A., Hameed, R., and Mazhar, M. S. 2011. Performance of hot water phytosanitary treated mangoes for intended export from Pakistan to Iran and China. International Journal of Agricultural and Biology 13: 645-651.
- Jadeja, K. B., and Vaisnav, M. U. 1984. Effective spray schedule for control of anthracnose and leaf blight of mango. Indian Journal of Plant Protection 12: 93-96.

- Kongtragoul, P., Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Izumi, Y., and Akimitsu, K. 2011. Mutation at codon 198 of *TUB2* gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. *Journal of Plant Protection Research* 51: 377-384.
- Kumar, A. S., Reddy, N. P. E., and Reddy, K. H. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathology Bulletin* 16: 157-160.
- Kuo, K. C. 2001. Sensitivity of mango anthracnose pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*, to the fungicide prochloraz in Taiwan. *Proceedings of the National Science Council* 25: 174-179.
- Lim, T. K. 1980. Chemical control of mango anthracnose in Malaysia, *in vitro* fungitoxicity of selected chemicals. *Pertanika* 3: 5-9.
- López-Vásquez, J. M., y Castaño-Zapata, J. 2010. Manejo de la antracnosis [*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld and H. Schrenk] del mango en postcosecha. *Agronomía* 18(1): 47-57.
- Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853-863.
- Marques, M. W., Lima, N. B., Morais Jr., M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L., and Camara, M. P. S. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61: 181-193.
- Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D., and Freeman S. 2006. Identification and characterization of benomyl-resistant and sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from Statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96: 542-548.

- McMillan, Jr. R. T. 1984. Control of mango anthracnose with foliar sprays. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 97: 344-345.
- Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Miyake, C., Izumi, Y., Akitmitsu, K., and Kongtragoul, P. 2010. Point mutations in the beta-tubulin gene conferred carbendazim-resistant phenotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose. Journal of Agricultural Technology 6: 365-378.
- Narkar, S. P., Shetty, D. S., Sawant, I. S., and S. D. Sawant. 2012. Paradigm shift in the resistance of grape isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* to carbendazim and their bio-control by *Trichoderma harzianum*. Indian Phytopathology 65(4): 373-377.
- Oosthuysen, S. A. 2000. Differences in the effect on various packline fungicidal treatments on the manifestation of disease in mango. Acta Horticulturae 509: 725-731.
- Pandey, A., Yadava, L. P., Mishra, R. K., Pandey, B. K., Muthukumar, M., and Chauhan, U. K. 2012. Studies on the incident and pathogenesis of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causes anthracnose of mango. International Journal of Science and Nature 3(2): 220-232.
- Paull, R. E., and Duarte, O. 2011. Tropical Fruits. Second Edition. Volume 1. CABI Publishing. London, UK. 400 p.
- Peres, N. A. R., Souza, N. L., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from Citrus. Plant Disease 88: 125-130.
- Ploetz, R. C. 2003. Diseases of mango. In: Diseases of Tropical Fruit Crops, Ploetz, R. C. (ed.). CABI Publishing. London, UK. pp. 327-363
- Prusky, D., Kobilier, I., Miyara, I., and Alkan, N. 2009. Fruit Diseases. In: Litz, R. E (ed.) The Mango: Botany, Production and Uses. CABI Publishing. London, UK. pp: 210-230.

- Ray, S. K., Das, S., Hasan, M. A., and Jha, S. 2009. Efficacy of different fungicides for the management of anthracnose of mango on old and rejuvenated orchard in West Bengal. *Acta Horticulturae* 820: 529-534.
- Rivas, B. A., y Carrizales, L. 2007. Control químico de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en pre y postcosecha en el municipio de Cedeño, estado de Monagas, Venezuela. *Bioagro* 19: 19-25.
- Russell, P. E., 2004. Sensitivity Baselines in Fungicide Resistance Research and Management. Monograph No. 3. Fungicide Resistance Action Committee. Brussels, Belgium. 57 p.
- Rondón, O., de Albarracín, N. S., y Rondón, A. 2006. Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango. *Agronomía Tropical* 56: 219-235.
- Sanders, G. M., Korsten, L., and Wehner, F. C. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 106: 745-752.
- Sandoval-Sánchez, M., Nieto-Ángel, D., Sandoval-Islas, J. S., Téliz-Ortiz, D., Orozco-Santos, M., and Silva-Rojas, V. 2013. Fungi associated to stem-end rot and dieback of mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-63.
- Spalding, D. H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. *Plant Disease* 66: 1185-1186.
- Swart, S. H., Serfontein, J. J., Swart, G., and Labuschagne, C. 2009. Chemical control of post-harvest diseases of mango: the effect of fludioxinil and prochloraz on soft brown rot, stem-end rot and anthracnose. *Acta Horticulturae* 820: 503-509.
- Tovar-Pedraza, J. M. 2014. Caracterización fenotípica, molecular, patogénica y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del mango en

- México. Capítulo I. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico, México. 116 p.
- Wong, F. P., de la Cerda, K. A., Hernández-Martínez, R., and Midland, S. L. 2008. Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. *Plant Disease* 92: 239-246.
- Xu, D. G., Pan, R. Q., and Zheng, Z. 2004. Monitoring of the resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango anthracnose to the fungicide carbendazim. *Journal of South China Agricultural University* 25: 35-37.
- Yang, Y., He, S. H., Zhang, S. J., and Hu, M. J. 2008. Resistance of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* to carbendazim in Hainan province. *Chinese Journal of Tropical Crops* 29: 73-77.
- Young, J. R., Tomaso-Peterson, M., de la Cerda, K. A., and Wong, F. P. 2010. Two mutations in *B-tubulin 2* gene associated thiophanate-methyl resistance in *Colletotrichum cereale* isolates from creeping bentgrass in Mississippi and Alabama. *Plant Disease* 94: 207-212.
- Yousef, Y. A., and Akasheh, T. S. 2011. Photolysis of some benzimidazole base pesticides. *In: Pesticides in the Modern World: Trends in Pesticides Analysis*. Stoytcheva, M. (ed.). InTech Publisher. pp 43-54.
- Zhan, R.L., Li, W., and Zheng, F. C. 2005. Studies on carbendazim-resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango fruit. *Acta Phytopylacica Sinica* 32: 71-76.
- Zhan, R. L., and Huang, J. S. 2007. Cloning of a carbendazim-resistant gene from *Colletotrichum gloeosporioides* of mango in South China. *African Journal of Biotechnology* 6: 143-147.
- Zhang, L. H., Li, M., Gao, Z. Y., Zhang, Z. K., Yang, F. Z., Xie, Y. X., Hu, M. J., and Yang, Y. 2013. Screening and cross-resistance analysis of alternative fungicides against

carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. from mango (*Mangifera indica* L.). Acta Horticulturae 992: 415-421.

CAPÍTULO III

RESISTENCIA A FUNGICIDAS QoI EN AISLADOS DEL COMPLEJO *Colletotrichum gloeosporioides* CAUSANTES DE LA ANTRACNOSIS DEL MANGO EN MÉXICO

RESUMEN

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad más importante del mango en pre- y postcosecha a nivel mundial. En México, esta enfermedad es causada por *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. ignotum*. Los fungicidas inhibidores externos de la quinona (QoI) se han aplicado para controlar la antracnosis del mango en los mayores países productores de este frutal. Sin embargo, el desarrollo de resistencia a esta clase de fungicidas constituye una amenaza importante para el control exitoso de la enfermedad. En este estudio, se determinó la sensibilidad a azoxystrobin y kresoxim-metil en 100 aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* colectados en huertos comerciales de mango en los principales estados productores de México, durante muestreos realizados de 2010 a 2013. De los 100 aislados, 84 se colectaron en huertos que habían recibido aplicaciones de azoxystrobin; los otros 16 se colectaron en huertos nunca tratados con fungicidas QoI (subpoblación línea base). Los aislados se evaluaron usando una prueba *in vitro*, con la que determinó la concentración efectiva a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE₅₀), para cada combinación de aislado-fungicida. Los valores de CE₅₀ de los aislados con sensibilidad base variaron de 0.0016 a 0.0397 µg mL⁻¹ (media = 0.0131 µg mL⁻¹) para azoxystrobin y de 0.0335 a 0.1106 µg mL⁻¹ (media = 0.0748 µg mL⁻¹) para kresoxim-metil. Mientras que los valores de CE₅₀ para los aislados expuestos a aplicaciones con fungicidas en campo variaron de 0.0402 a >1000 µg mL⁻¹ y de 0.0413 a >1000 µg mL⁻¹ para azoxystrobin y kresoxim-metil, respectivamente. El análisis de correlación (r = 0.84) confirmó que existe resistencia cruzada entre los fungicidas de la clase QoI. Además, los resultados de este estudio demostraron la presencia de aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* altamente resistentes a fungicidas QoI en huertos de mango de México.

Palabras clave: *Mangifera indica*, *Colletotrichum*, azoxystrobin, kresoxim-metil, resistencia.

CHAPTER III

RESISTANCE TO QoI FUNGICIDES IN ISOLATES OF *Colletotrichum gloeosporioides* COMPLEX CAUSING MANGO ANTHRACNOSE IN MEXICO

ABSTRACT

Anthracnose, caused by *Colletotrichum* spp., is the most important pre- and postharvest disease of mango worldwide. In México, this disease is caused by *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* and *C. ignotum*. Quinone outside inhibitor (QoI) fungicides has been applied to control mango anthracnose in the major mango growing countries. However, the development of resistance to this fungicide class constitutes an important threat for the successful control of the disease. In this study, 100 isolates of *C. gloeosporioides* complex from 100 commercial orchards were collected between 2010 and 2013 in the major mango growing states of Mexico. Isolates were tested for their sensitivity to azoxystrobin and kresoxim-methyl. Eighty-four isolates were collected from orchards that had been exposed to azoxystrobin, and 16 isolates were collected from orchards never treated with QoI fungicides (baseline population). All isolates were tested using an *in vitro* assay to determine the effective fungicide concentration at which 50% of mycelial growth was inhibited (EC_{50}) for each isolate-fungicide combination. EC_{50} values of the baseline isolates ranged from 0.0016 to 0.0397 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean = 0.0131 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for azoxystrobin and from 0.0335 to 0.1106 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mean = 0.0748 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for kresoxim-methyl. Whereas, EC_{50} values ranged from 0.0402 to >1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for isolates exposed to azoxystrobin and from 0.0413 to >1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for kresoxim-methyl. Cross-resistance among the class of QoI fungicides was confirmed by a correlation analysis ($r = 0.84$). Results from this study determined the presence of resistance to QoI fungicides in isolates of *C. gloeosporioides* complex from mango in Mexico.

Key words: *Mangifera indica*, *Colletotrichum*, azoxystrobin, kresoxim-methyl, resistance.

INTRODUCCIÓN

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* spp., es la enfermedad pre- y postcosecha más importante del mango a nivel mundial (Ploetz *et al.*, 2003; Paull y Duarte, 2011). La incidencia de esta enfermedad puede llegar a 100% en fruta producida en condiciones de alta humedad (Arauz, 2000; Ploetz *et al.*, 2003; Prusky *et al.*, 2009). Los fungicidas sistémicos pertenecientes a la clase metil-benzimidazol-carbamatos (MBC) e inhibidores externos de la quinona (QoI) son una herramienta comúnmente usada para el manejo de la antracnosis del mango en condiciones de campo (Pandey *et al.*, 2012; Diedhiou *et al.*, 2014).

El modo de acción de los fungicidas QoI se basa en la inhibición de la respiración mitocondrial mediante la unión al sitio Qo del complejo enzimático del citocromo *bc*₁ (complejo respiratorio III). Esta inhibición bloquea el proceso de transferencia de electrones entre el citocromo b y el citocromo *c*₁, ocasionando la deficiencia de energía en las células fúngicas, debido a la falta de producción de adenosina trifosfato (ATP) (Barlett *et al.*, 2002; Gisi *et al.*, 2002; Yamaguchi y Fujimora, 2005; Grasso *et al.*, 2006; Fernández-Ortuño *et al.*, 2008). Esta clase de fungicidas muestra actividad sobre una amplia gama de hongos fitopatógenos de importancia económica (Ypema y Gold, 1999; Grasso *et al.*, 2006), dada su larga actividad residual y sus propiedades biocinéticas (Ypema y Gold, 1999).

Después de la introducción comercial de los primeros fungicidas de la clase QoI (azoxystrobin y kresoxim-metil), en 1996, para el control de enfermedades en cereales, se detectaron aislados resistentes en poblaciones de campo en *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* y, posteriormente, la resistencia se observó en otros de los principales hongos fitopatógenos,

incluyendo a *Podosphaera xanthii*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Plasmopara viticola*, *Mycosphaerella fijiensis* y *Venturia inaequalis* (Heaney *et al.*, 2000; Gisi *et al.*, 2002).

Actualmente, la resistencia a fungicidas QoI se ha reportado en al menos tres géneros de oomicetes y 27 géneros de hongos (FRAC, 2012), incluyendo especies de *Colletotrichum* como *C. cereale*, en pastos de golf, en Japón (Avila-Adame *et al.*, 2003) y EE.UU. (Avila-Adame *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2007; Mitkowski *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2010), además de *C. gloeosporioides*, en fresa, en Japón (Inada *et al.*, 2008). En el caso de aislados de *C. gloeosporioides* de mango se ha reportado la presencia de aislados resistentes a fungicidas QoI en huertos comerciales de China (Zhang *et al.*, 2013).

Azoxystrobin tiene actividad erradicante, translaminar, protectante y cierto nivel de movimiento en los tejidos (quasi-sistemicidad), dando a este fungicida el potencial para usarse en tratamientos al suelo y a la semilla, además de aplicaciones foliares. Así mismo, su versatilidad y actividad de amplio espectro se ha demostrado contra una amplia variedad de enfermedades económicamente importantes (Gullino *et al.*, 2000). En general, este fungicida se ha evaluado para el control de la antracnosis del mango, con resultados efectivos en huertos comerciales de Brasil (Sales-Junior *et al.*, 2004), Australia (Stovolt y Dirou, 2004), India (Sundravadana *et al.*, 2006, 2007; Adhikary *et al.*, 2013), Sudáfrica (Swart *et al.*, 2009), China (Huang *et al.*, 2012) y Senegal (Diedhiou *et al.*, 2014).

Este fungicida QoI se usa en huertos de mango de México para el control de la antracnosis. Sin embargo, no se ha documentado la sensibilidad *in vitro* de *Colletotrichum* spp. a fungicidas QoI. Los objetivos de este estudio fueron: establecer la distribución de la sensibilidad base a azoxystrobin y kresoxim-metil, mediante prueba de inhibición del crecimiento micelial, en

poblaciones de campo de aislados del complejo *C. gloeosporioides* de mango; y determinar si se presenta resistencia a azoxystrobin y kresoxim-metil en aislados de campo del complejo *C. gloeosporioides* de huertos de mango, en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección y mantenimiento de aislados del complejo *C. gloeosporioides*

Los 100 aislados del complejo *C. gloeosporioides* usados en este estudio se identificaron previamente, mediante caracterización morfológica, pruebas de patogenicidad y análisis de secuencias *Apn2Mat* IGS, como responsables de causar la antracnosis del mango en México (Tovar-Pedraza, 2014). Estos aislados se obtuvieron a partir tejidos sintomáticos de diferentes cultivares de mango y se recolectaron en 100 huertos comerciales de los principales estados productores en México, durante muestreos realizados de 2010 a 2013 (Cuadro 1). De los 100 aislados, 84 se colectaron en huertos que habían recibido aplicaciones de azoxystrobin (subpoblación expuesta); los otros 16 se colectaron en huertos nunca tratados con fungicidas QoI (subpoblación con sensibilidad base).

Cuadro 1. Origen, año de colecta y numero de aislados del complejo *C. gloeosporioides* usados en ensayos de sensibilidad *in vitro* a fungicidas QoI.

Origen geográfico	Clave de aislados	Año de colecta	Aislados expuestos	Aislados con sensibilidad base
Chiapas	CHI	2010	18	1
Nayarit	NAY	2012	14	2
Sinaloa	SIN	2012	14	1
Veracruz	VER	2011	8	4
Michoacán	MICH	2011	8	2
Guerrero	GRO	2011	9	1
Oaxaca	OAX	2012	6	2
Colima	COL	2012	5	0
Campeche	CAM	2013	1	2
Tabasco	TAB	2013	1	1

Todos los aislados se mantuvieron como suspensión de esporas y discos miceliales en glicerol a 20% y bajo temperatura de -80 °C para almacenamiento a largo plazo. Para almacenamiento a corto plazo se conservaron en agua destilada estéril a 4 °C. Subcultivos frescos se obtuvieron mediante transferencia de discos miceliales a cajas Petri, con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA; Difco[®], Francia).

Fungicidas

En este estudio se usaron productos comerciales de los fungicidas azoxystrobin (Amistar[®], SYNGENTA) y kresoxim-metil (Stroby[®], BASF). Las concentraciones evaluadas de los fungicidas se basaron en el ingrediente activo.

Efecto del azoxystrobin en la inhibición del crecimiento micelial

El efecto del fungicida azoxystrobin se determinó para 100 aislados (16 de la subpoblación con sensibilidad base y 84 de la subpoblación expuesta) de especies del complejo *C. gloeosporioides* mediante una prueba de inhibición del crecimiento micelial. Para ello, se preparó una solución madre de azoxystrobin y se agregó la cantidad adecuada del fungicida a medio PDA fundido y esterilizado, para obtener concentraciones finales de 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50 μg i.a. mL^{-1} . Con la finalidad de bloquear la respiración alternativa del hongo (Zyogas *et al.*, 1997; Olaya y Koller, 1999; Barlett *et al.*, 2002), en metanol (1:1) se preparó una solución madre de ácido salicil-hidroxiácido (SHAM, 99% i.a.; Sigma-Aldrich Inc., St. Louis) y se agregó la cantidad adecuada al medio combinado con fungicida para obtener una concentración final de SHAM de 100 μg mL^{-1} . Las cajas Petri testigo (sin fungicida) también se combinaron con SHAM. Esta concentración de SHAM no presenta efecto sobre el crecimiento micelial de los hongos y provee un completo sinergismo de la acción de los fungicidas QoI en ensayos *in vitro* (Olaya y Koller, 1999; Barlett *et al.*, 2002; Avila-Adame *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2009). Todas las cajas con medio PDA combinado con fungicida se almacenaron en condiciones de oscuridad continua a 20 °C durante 24 h, antes de usarlas en la prueba.

Se tomaron discos miceliales de 5 mm de diámetro del margen con crecimiento activo de una colonia de 5 días de edad y se colocaron en el centro de las cajas Petri, con medio de cultivo con las diferentes concentraciones de azoxystrobin. Las cajas se incubaron durante 6 días, a 28 °C y en oscuridad continua. Para cada aislado, se usaron tres repeticiones por concentración. El diámetro de la colonia en cada caja se midió perpendicularmente, en dos direcciones, y se promedió. La prueba de inhibición del crecimiento micelial se realizó dos veces.

Para cada aislado, la concentración efectiva que inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) se calculó mediante una regresión lineal simple del porcentaje de inhibición relacionado con el crecimiento micelial del testigo contra la transformación \log_{10} para cada una de las siete concentraciones de azoxystrobin usando PROC REG de SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1.3 SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.). El promedio de los valores de CE_{50} para cada aislado en los dos experimentos se usó en el análisis de datos. Previamente, se realizó una prueba de normalidad, a fin de cumplir con los supuestos estadísticos.

Resistencia cruzada entre fungicidas QoI

Cuarenta aislados del complejo de *Colletotrichum gloeosporioides* se seleccionaron aleatoriamente, para determinar la sensibilidad a kresoxim-metil usando la prueba de inhibición del crecimiento micelial ya descrita anteriormente. Los valores de CE_{50} de kresoxim-metil se calcularon para cada aislado, como se describió arriba, para el caso del fungicida azoxystrobin. La asociación entre la sensibilidad cruzada a fungicidas QoI se determinó con los valores de CE_{50} de azoxystrobin versus valores de CE_{50} de kresoxim-metil para 40 aislados del complejo *C. gloeosporioides*, con una correlación Pearson usando PROC CORR de SAS ($P = 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del azoxystrobin sobre el crecimiento micelial

En este estudio, la subpoblación de aislados del complejo *C. gloeosporioides* con sensibilidad base (n =16) a azoxystrobin mostraron valores de CE₅₀ que variaron de 0.0016 a 0.0397 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1). Resalta el hecho de que 50% de dicha subpoblación presentó valores de CE₅₀ de 0.0016 a 0.010 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De manera similar, Mondal *et al.* (2005) registraron valores de sensibilidad base al azoxystrobin de 0.09 a 0.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y de 0.01 a 0.034, para pyraclostrobin en aislados de *C. acutatum* obtenidos de huertos de cítricos en Florida, EE.UU., mediante ensayos de inhibición del crecimiento micelial con medio con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de SHAM. Por su parte, Schnabel *et al.* (2006) estimaron valores CE₅₀ de azoxystrobin que variaron de 0.01 a 0.55 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para aislados de *C. acutatum* obtenidos de durazno.

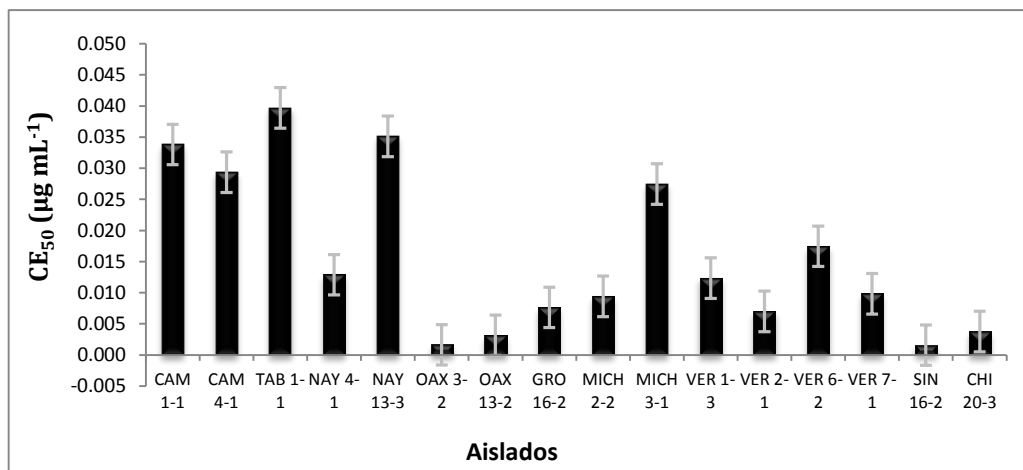


Figura 1. Valores de concentración efectiva de azoxystrobin a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE₅₀) para 16 aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* de la subpoblación con sensibilidad base, los cuales se colectaron en huertos comerciales de mango, en México, sin historial de aplicaciones de fungicidas QoI.

Diferentes estudios han señalado que los ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial son adecuados para determinar la sensibilidad a fungicidas QoI en aislados de *C. gloeosporioides* (Sundravadana *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013), *C. acutatum* (Mondal *et al.*, 2005; Gutiérrez-Chapin *et al.*, 2006; Schnabel *et al.* 2006), *C. capsici* (Jin *et al.*, 2009), *C. cereale* (Crouch *et al.*, 2005), *C. dematium* (Gutiérrez-Chapin *et al.*, 2006) y *C. coccodes* (Gutiérrez-Chapin *et al.*, 2006).

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo por Gutiérrez-Alonso *et al.* (2003), se reportaron valores de CE₅₀ de 0.0000013, 0.0000064, 0.0000141 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxystrobin en aislados de *C. gloeosporioides* colectados en huertos de mango de Veracruz, Guerrero y Sinaloa, respectivamente. Lo anterior contrastó con nuestros resultados. Sin embargo, la diferencia en la sensibilidad puede deberse a que en este trabajo se determinó la sensibilidad a azoxystrobin usando una prueba de inhibición del crecimiento micelial, mientras que Gutiérrez-Alonso *et al.* (2003) realizaron una prueba de germinación de conidios. En este mismo, sentido Olaya *et al.* (1998) y Jin *et al.* (2009) indicaron que la germinación de esporas puede ser más sensible que el crecimiento micelial para efectos inhibitorios de los fungicidas QoI. Por su parte, Balba (2007) señaló que el azoxystrobin tiene excelentes efectos contra el crecimiento micelial y la germinación de esporas de hongos fitopatógenos; mientras que el kresoxim-metil exhibe mayor efectividad contra la germinación de esporas. Gullino *et al.* (2000) señalaron que el kresoxim-metil es más efectivo contra germinación de esporas que contra el crecimiento micelial, lo que se relaciona con la dependencia de la espora a la respiración mitocondrial durante el proceso de germinación. Además, la sensibilidad inferior del micelio al fungicida puede estar relacionada con su débil dependencia a la respiración durante el crecimiento vegetativo o la posibilidad de que la ruta alterna del transporte de electrones puede ser inducida en el micelio, pero no en esporas.

La prueba de inhibición del crecimiento micelial realizada con aislados del complejo *C. gloeosporioides* en medio de cultivo PDA, con siete diferentes concentraciones de azoxystrobin, mostró que algunos aislados fueron ligeramente inhibidos a concentraciones de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El crecimiento micelial de los aislados con sensibilidad base se inhibió progresivamente a medida que aumentaba la concentración de azoxystrobin, resultando en una completa inhibición a concentraciones de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 2). Esto reveló la existencia en México de aislados resistentes a este fungicida. La afirmación anterior se puede sustentar con lo reportado por Sundravadana *et al.* (2006) y Sundravadana *et al.* (2007), quienes encontraron que el crecimiento micelial de un aislado sensible de *C. gloeosporioides*, colectado en un huerto de mango en India se inhibió completamente con una concentración de azoxystrobin de 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Mientras que Adhikary *et al.* (2013) registraron un aislado de *C. gloeosporioides* de mango en India, el cual fue capaz de crecer a concentraciones de azoxystrobin de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

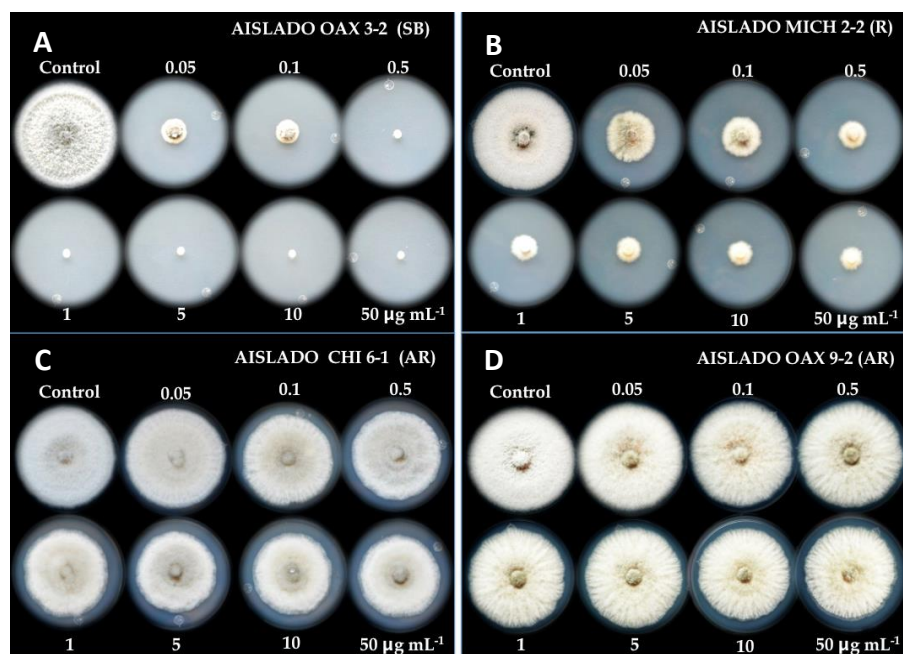


Figura 2. Efecto de siete concentraciones del fungicida azoxystrobin sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados del complejo *C. gloeosporioides* obtenidos de huertos de mango, en México. (A) Aislado con sensibilidad base (sb). (B) Aislado resistente (r). (C-D) Aislados altamente resistentes (ar).

En este estudio, la subpoblación expuesta ($n = 84$) a fungicidas QoI presentó valores de CE_{50} , para azoxystrobin, que fluctuaron de 0.0402 a 6413.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Resalta el hecho que 70.2% de los aislados expuestos presentaron valores de $CE_{50} > 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3). Estos resultados confirmaron que existe resistencia al azoxystrobin en aislados del complejo *C. gloeosporioides* en huertos comerciales de mango de México. De manera similar, Zhang *et al.* (2013) realizaron pruebas de inhibición del crecimiento micelial con aislados de *C. gloeosporioides* colectados en huertos de mango de China y estimaron valores de CE_{50} de 0.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para el caso de un aislado sensible, y de 8.71-615.55 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para aislados resistentes a azoxystrobin. Por su parte, Avila-Adame *et al.* (2003) reportaron la presencia de aislados de *C. cereale* altamente resistentes a azoxystrobin, los cuales presentaron valores de $CE_{50} > 10 \mu\text{g mL}^{-1}$, con base en resultados de ensayos de inhibición del crecimiento micelial. Además, encontraron que los mecanismos responsables de un alto nivel de resistencia al azoxystrobin no estaban relacionados con la respiración alternativa y que el efecto sinérgico dado a la adición de SHAM se observa solo para algunos aislados.

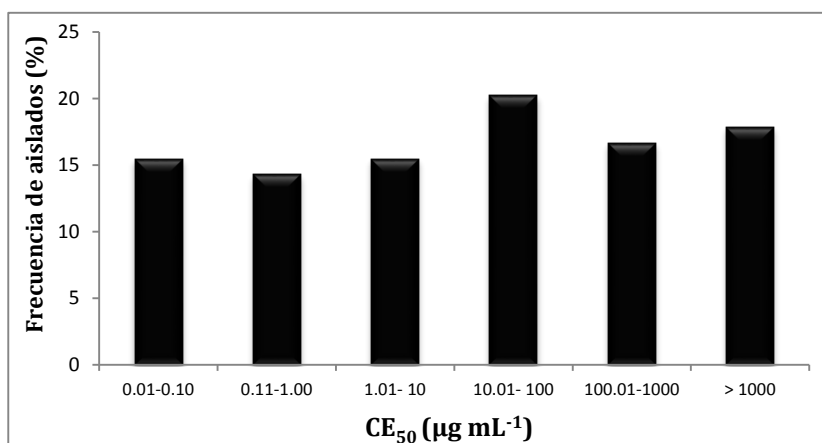


Figura 3. Distribución de frecuencia de valores de concentración efectiva de azoxystrobin a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para 84 aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* de la subpoblación colectada en huertos comerciales de mango con historial de aplicaciones de fungicidas QoI.

Distribución en México de aislados resistentes a azoxystrobin

En la Figura 4 se observa la distribución geográfica y porcentaje de frecuencia de aislados sensibles y resistentes a azoxystrobin en los diferentes estados productores de mango en México. Dicho porcentaje de frecuencia se determinó en base al valor de CE_{50} para los 84 aislados expuestos a aplicaciones de fungicidas QoI en condiciones de campo. En general, se observó que los aislados resistentes ($CE_{50} > 1 \mu\text{g mL}^{-1}$) a este fungicida QoI, se encuentran distribuidos en los principales estados productores de este frutal como son: Chiapas, Colima, Guerrero, Nayarit, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz. Ya que estos estados presentaron al menos 50% de sus aislados con algún nivel de resistencia.

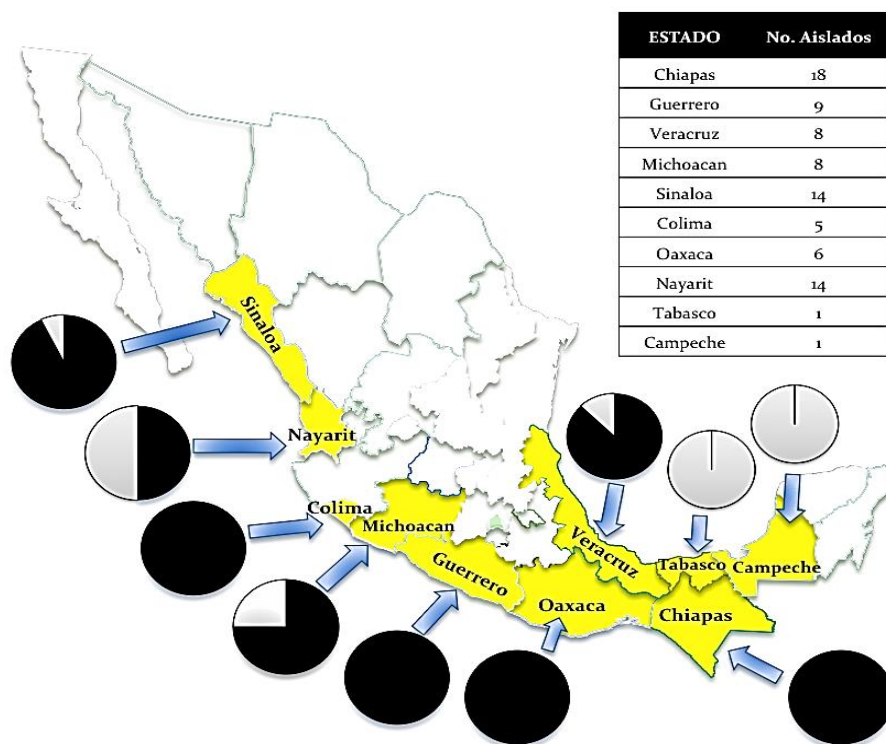


Figura 4. Sitios de colecta de aislados del complejo *C. gloeosporioides* evaluados en una prueba de inhibición del crecimiento micelial con el fungicida azoxystrobin. El número total de los aislados evaluados de cada estado se encuentra indicado en la tabla. El porcentaje de frecuencia de aislados sensibles (gris) y resistentes (negro) se encuentra representado en los círculos.

Resistencia cruzada a fungicidas QoI

La comparación de valores de CE_{50} de los fungicidas azoxystrobin y kresoxim-metil mostraron la presencia de correlación ($r = 0.84$) en la resistencia. Asimismo, se observó que el crecimiento micelial de los ocho aislados de la subpoblación base fue más sensible al azoxystrobin ($CE_{50} = 0.0016 - 0.0397 \mu\text{g mL}^{-1}$) que al kresoxim-metil ($CE_{50} = 0.0335 - 0.1106 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 5). Este resultado coincidió con lo reportado por Zhang *et al.* (2013), quienes realizaron prueba de inhibición del crecimiento micelial con aislados de *C. gloeosporioides* colectados en huertos de mango de China, y estimaron valores de CE_{50} de $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, para azoxystrobin, y de $0.13 \mu\text{g mL}^{-1}$, para kresoxim-metil, en el caso de aislados sensibles.

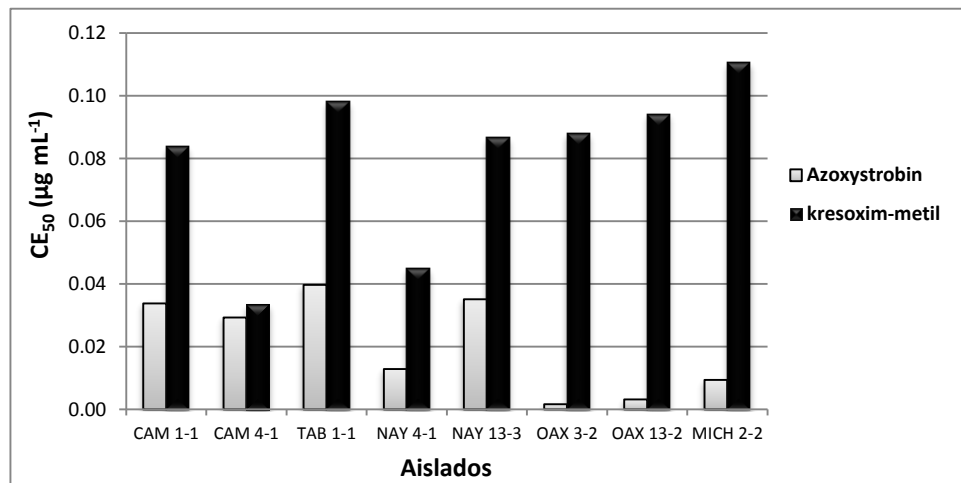


Figura 5. Valores de concentración efectiva de azoxystrobin y kresoxim-metil a cual se inhibe 50% del crecimiento micelial (CE_{50}) para ocho aislados del complejo *Colletotrichum gloeosporioides* de la subpoblación con sensibilidad base, los cuales se colectaron en huertos comerciales de mango, en México, sin historial de aplicaciones de fungicidas QoI.

En general, este estudio mostró cierta variación del nivel de resistencia para los fungicidas azoxystrobin y kresoxim-metil. Sin embargo, la correlación evidenció la presencia de resistencia cruzada entre estos dos fungicidas QoI. De manera similar, otros estudios han reportado

resistencia cruzada entre fungicidas QoI en aislados de *C. cereale* (Avila-Adame *et al.*, 2003), *Mycosphaerella graminicola* (Miguez *et al.*, 2003) y *Alternaria* spp. (Ma *et al.*, 2003).

Desde su introducción al mercado, los fungicidas QoI han llegado a ser un componente esencial dentro de los programas de control químico de enfermedades, debido a su amplia eficacia contra un gran número de enfermedades fúngicas de importancia en la agricultura (Bartlett *et al.*, 2002; Fernández-Ortuño *et al.*, 2008). Asimismo, la detección de diversos hongos fitopatógenos resistentes a esta clase de fungicidas ha ocasionado que no se recomiende más el uso de estos fungicidas en ciertos cultivos, como sucede en cereales (Fernández-Ortuño *et al.*, 2008).

En México, la presencia de aislados del complejo *C. gloeosporioides* altamente resistentes a fungicidas de la clase QoI se puede deber a la continua aplicación de estos fungicidas en huertos de mango, tanto para el control de la antracnosis (*Colletotrichum* spp.) como para el control de la cenicilla (*Pseudoidium anacardii*). En este sentido, diversos autores han confirmado la alta efectividad del kresoxim-metil y trifloxystrobin (fungicidas QoI) para el control de la cenicilla del mango, en condiciones de campo (Reuveni *et al.*, 1998; Reuveni, 2000).

Los datos de sensibilidad determinados en este estudio permitirán monitorear variaciones posteriores en la sensibilidad de poblaciones de *Colletotrichum* de mango a fungicidas QoI. Entre tanto, se sugiere realizar análisis de secuencias del gen Citocromo *b* en aislados de *Colletotrichum* spp. con sensibilidad base y en aislados con diferente nivel de resistencia a fungicidas QoI. Esto con la finalidad de determinar si existe una mutación en este gen y en caso de que exista, conocer la relación entre el sitio de mutación y el nivel de sensibilidad que presentan dichos aislados.

CONCLUSIONES

Los valores de CE_{50} (concentración efectiva a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial) para los aislados expuestos a aplicaciones con fungicidas QoI en campo variaron de 0.0402 a $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de 0.0413 a $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxystrobin y kresoxim-metil, respectivamente. Lo que evidenció la presencia de aislados de *Colletotrichum* spp. altamente resistentes a fungicidas QoI en huertos de mango de México.

Este estudio mostró variación del nivel de resistencia para los fungicidas azoxystrobin y kresoxim-metil. Sin embargo, en análisis de correlación ($r = 0.84$) indicó la presencia de resistencia cruzada a estos dos fungicidas QoI en los aislados de *Colletotrichum*.

Los resultados obtenidos de los estudios de sensibilidad en este estudio permitirán monitorear variaciones posteriores en la sensibilidad de poblaciones de *Colletotrichum* de mango a fungicidas de las clases MBC, QoI y DMI.

LITERATURA CITADA

- Adhikary, N. K., Dey, S., and Tarafdar, J. 2013. Studies on morphology of mango anthracnose disease causing fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. And efficacy of azoxystrobin against the fungus under *in vitro* and *in vivo* condition. The Bioscan 8: 493-497.
- Arauz, L. F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. Plant Disease 84: 600-611.

- Avila-Adame, C., Olaya, G., and Koller, W. 2003. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobirulin-related QoI fungicides. *Plant Disease* 87: 1426-1432.
- Balba, H. 2007. Review of strobirulin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health* 42: 441-451.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., and Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58: 649–662.
- Crouch, J. A., Clarke, B. B., and Hillman, B. I. 2005. Phylogenetic relationship and fungicide sensitivities of *Colletotrichum graminicola* from turfgrass in North America. *International Turfgrass Society Research Journal* 10: 186-195.
- Diedhiou P. M., Diallo, Y., Faye, R., Mbengue, A. A., and Sene, A. 2014. Efficacy of different fungicides against mango anthracnose in Senegalese Soudanian agroclimate. *American Journal of Plant Sciences* 5: 2224-2229.
- Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., de Vicente, A., and Pérez-García, A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* 11: 1-9.
- FRAC. 2012. List of pathogens with field resistance towards QoI fungicides. Disponible en: <http://www.frac.info/>
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58: 859-867.

- Grasso, V., Palermo, S., Sierotzki, H., Garibaldi, A., and U. Gisi. 2006. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Qo inhibitors fungicides in plant pathogens. *Pest Management Science* 62: 465-472.
- Gullino, M. L., Leroux, P., and Smith, M. C. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19: 1-11.
- Gutiérrez-Alonso, J. G., Gutiérrez-Alonso, O., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejía, E., Delgadillo-Sánchez, F., y Vaquera-Huerta, H. 2003. Evaluación de resistencia a imazalil, prochloraz y azoxystrobin en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y control de la antracnosis del mango (*Mangifera indica* L.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 379-383.
- Gutierrez-Chapin, L. J., Wang, Y., Lutton, E., and McSpadden-Gardener, B. B. 2006. Distribution and fungicide sensitivity of fungal pathogens causing anthracnose-like lesion on tomatoes grown in Ohio. *Plant Disease* 90: 397-403.
- Heaney, S. P., Hall, A. A., Davies, S. A., and Olaya, G. 2000. Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross resistance group: current perspectives. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference. Pest and Diseases* 2: 755-762.
- Huang, S., Zhu, G., Qin, L., Zhou, X., Huang, F., Li, Q., Yan, W., Huang, H., Cen, Z., Fu, G., and Hu, C. 2012. Enhancement of efficacy in controlling postharvest decays and extending shelf life of mangoes by combined pre- and post-harvest chemical applications. *International Journal of Agriculture and Biology* 14: 176-182.
- Inada, M., Ishii, H., Chung, W. H., Yamada, T., Yamaguchi, J., and Furuta, A. 2008. Occurrence of strobirulin resistant strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cigulata*),

the causal fungus of strawberry anthracnose. *Japanese Journal of Phytopathology* 74(2): 114-117.

Jin L. H., Chen. Y., Chen, C. J., Wang, J. X., and Zhou. M. G. 2009. Activity of azoxystrobin and SHAM to four phytopathogens. *Agricultural Science in China* 8: 835-842.

Karaoglanidis, G. S., and Thanassouloupoulos, C. C. 2003. Cross-resistance patterns among sterol biosynthesis inhibiting fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 929-934.

Ma, Z., Felts, D., and Michailides, T. J. 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77: 66-74.

Miguez, M., Reeve, C., Wood, P., and Hollomon, D. W. 2003. Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QoI fungicides. *Pest Management Science* 60: 3-7.

Mitkowski, N. A., Madeiras, A. M., Chaves, A., and Wick, R. 2009. Fungicide sensitivity of *Colletotrichum cereale* isolated from turfgrasses in the Northeastern United States. *Applied Turfgrass Science* 6: 917-927.

Mondal, S. N., Bathia, A., Shilts, T., and Timmer, L. W. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin and fenuconazole. *Plant Disease* 89: 1186-1194.

Olaya, G., Zheng, D., and Koller, W. 1998. Differential responses of germinating *Venturia inaequalis* conidia to kresoxim-methyl. *Pesticide Science* 54: 230-236.

- Olaya, G., and Koller, W. 1999. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pesticide Science* 55: 1083-1088.
- Pandey, A., Yadava, L. P., Mishra, R. K., Pandey, B. K., Muthukumar, M., and Chauhan, U. K. 2012. Studies on the incident and pathogenesis of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causes anthracnose of mango. *International Journal of Science and Nature* 3(2): 220-232.
- Paull, R. E., and Duarte, O. 2011. *Tropical Fruits*. Second edition. Vol 1. CABI Publishing. London, UK. 400 p.
- Ploetz, R. C. 2003. Diseases of mango. *In: Diseases of Tropical Fruit Crops*. Ploetz, R. C (ed.) CABI Publishing. London, UK. pp. 327–363.
- Prusky, D., Kobilier, I., Miyara, I., and Alkan, N. 2009. Fruit Diseases. *In: Litz, R. E (ed.) The Mango: Botany, Production and Uses*. CABI Publishing. London, UK. pp: 210-230.
- Reuveni, M. 2000. Efficacy of trifloxystrobin (Flint), a new strobilurin fungicide, in controlling powdery mildew on apple, mango and nectarine and rust on prune trees. *Crop Protection* 19: 335-341.
- Reuveni, M., Harpaz, R.M., and Reuveni, R., 1998. Integrated control of powdery mildew on field-grown mango trees by foliar sprays of mono-potassium phosphate, sterol inhibitor fungicides and the strobilurin kresoxym-methyl. *European Journal of Plant Pathology* 104: 853-860.
- Sales-Junior, R., Costa, F. M., Marinho, R. E. M., Nunes, G. H. S., Amaro-Filho, J., e Miranda, V. S. 2004. Utilização de azoxistrobina no controle da antracnose da mangueira. *Fitopatologia Brasileira* 29: 193-196.

- Schnabel, G., Chai, W., and Cox, K. D. 2006. Identifying and characterizing summer diseases on “Babygold” peach in South Carolina. *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2006-0301-01-RS.
- Stovolt, G. E., and Dirou, G. E. 2004. Blight Disease in Mangoes. *Agnote*. New South Wales Department of Primary Industries, New South Wales, Australia.
- Sundravadana, S., Alice, D., Kuttalam, S., and Samiyappan, R. 2006. Control of mango anthracnose by azoxystrobin. *Tunisian Journal of Plant Protection* 1: 109-114.
- Sundravadana, S., Alice, D., Kuttalam, S., and Samiyappan, R. 2007. Efficacy of azoxystrobin on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz growth and on controlling mango anthracnose. *Journal of Agricultural and Biological Science* 2(3): 10-15.
- Swart, S. H., Swart, G., and Labuschagne, C. 2009. The effect of strategically timed pre-harvest fungicide applications on post-harvest decay of mango. *Acta Horticulturae* 820: 511-520.
- Tovar-Pedraza, J. M. 2014. Caracterización fenotípica, molecular, patogénica y sensibilidad a fungicidas de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del mango en México. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico, México. 116 p.
- Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M., and Karaoglanidis, G. S. 2011. Detection and molecular characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. *Plant Disease* 95: 1302-1307.

- Wong, F. P., Midland, S. L., and de la Cerda, K. 2007. Occurrence and distribution of QoI resistant isolates of *Colletotrichum cereale* from annual bluegrass in California. *Plant Disease* 91: 1536-1546.
- Yamaguchi, I., and Fijimura, M. 2005. Recent topics on action mechanisms of fungicides. *Journal of Pesticide Science* 30(2): 67-74.
- Young, J. R., Tomasp-Peterson, M., Tredway, L. P., and de la Cerda, K. 2010. Occurrence and molecular identification of azoxystrobin-resistant *Colletotrichum cereale* isolates from golf course putting greens in the southern United States. *Plant Disease* 94: 751-757.
- Ypema, H. L., and Gold, R. E. 1999. Kresoxim-methyl: Modification of naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* 83(1): 4-19.
- Zhang, L. H., Li, M., Gao, Z. Y., Zhang, Z. K., Yang, F. Z., Xie, Y. X., Hu, M. J., and Yang, Y. 2013. Screening and cross-resistance analysis of alternative fungicides against carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* Penz from mango (*Mangifera indica* L.). *Acta Horticulturae* 992: 415-421.
- Ziogas, B. N., Baldwin, B. C., and Young, J. E. 1997. Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide Science* 50(1): 28- 34.

CONCLUSIONES GENERALES

- La caracterización morfológica y cultural indicó que todos los aislados obtenidos de tejidos de mango con síntomas de antracnosis pertenecen al complejo *Colletotrichum gloeosporioides*. Sin embargo, los caracteres morfológicos de las estructuras de reproducción asexual y de las colonias no fueron útiles para discriminar a nivel de especie en este complejo.
- El análisis filogenético generado con las secuencias *Apn2/MAT* IGS de 38 aislados, reveló que *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola* son las especies asociadas a los síntomas de esta enfermedad. Asimismo, las especies *C. dianesei*, *C. tropicale* y *C. fructicola* identificadas en este estudio, se reportan por primera vez en asociación con síntomas de antracnosis en tejidos de mango, en México.
- Las pruebas de patogenicidad confirmaron que *C. dianesei*, *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola* son las especies responsables de causar la antracnosis del mango en México.
- La prueba de sensibilidad a fungicidas MBC (benomil y carbendazim) mostró que las especies de *Colletotrichum* responsables de causar la antracnosis del mango son altamente sensibles a esta clase de fungicidas.
- Los valores de sensibilidad base al procloraz variaron de 0.0048 a 0.0851 $\mu\text{g mL}^{-1}$, lo que indicó que los aislados evaluados fueron altamente sensibles a este fungicida.
- Los valores de CE_{50} (concentración efectiva a la cual se inhibe 50% del crecimiento micelial) para los aislados expuestos a aplicaciones con fungicidas QoI en campo variaron de 0.0402 a $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de 0.0413 a $> 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para azoxystrobin y kresoxim-metil, respectivamente. Lo que evidenció la presencia de aislados de *Colletotrichum* spp. altamente resistentes a fungicidas QoI en huertos de mango de México.

- Este estudio mostró variación del nivel de resistencia para los fungicidas azoxystrobin y kresoxim-metil. Sin embargo, el análisis de correlación ($r = 0.84$) evidenció la presencia de resistencia cruzada a estos dos fungicidas QoI en los aislados de *Colletotrichum*.
- Los resultados obtenidos de los estudios de sensibilidad en este estudio permitirán monitorear variaciones posteriores en la sensibilidad de poblaciones de *Colletotrichum* de mango a fungicidas de las clases MBC, QoI y DMI.

RECOMENDACIONES GENERALES

- Se sugiere llevar a cabo estudios de diversidad de especies de *Colletotrichum*, mediante la combinación de caracterización fenotípica y análisis de secuencias en otros cultivos, en los cuales este patógeno sea importante. Dado que la identificación apropiada de las especies de *Colletotrichum* es de gran relevancia para la toma de decisiones cuarentenarias y en la búsqueda de fuentes genéticas de resistencia a este hongo fitopatógeno. Asimismo, la detección exacta del patógeno puede generar datos para entender la epidemiología y las estrategias que se plantearan para el manejo de las enfermedades.
- Se propone la realización de investigaciones posteriores, con la finalidad de determinar el potencial de virulencia de las especies de *Colletotrichum*, de acuerdo con datos generados con infecciones naturales e infecciones artificiales.
- Se recomienda evaluar la respuesta a la infección por *Colletotrichum* spp. en las principales cultivares de mango que se producen en México, con la finalidad de determinar cuáles son los cultivares que presentan tolerancia a esta enfermedad, bajo los diferentes ambientes en los que se desarrolla este frutal.
- Se sugiere aplicar carbendazim en huertos comerciales de mango en México, dentro de un programa de manejo integral de la antracnosis en condiciones de campo, y sustituir al fungicida benomil, el cual está actualmente prohibido a nivel mundial. Además, el fungicida carbendazim también puede aplicarse como tratamiento postcosecha, ya que diversos estudios han mostrado excelente efectividad postcosecha de este fungicida en combinación con agua caliente. Sin embargo, debido a que este fungicida se considera

como de alto riesgo para inducir resistencia, su aplicación requiere tomar en cuenta las recomendaciones del FRAC para el manejo de la resistencia.

- Se recomienda utilizar el fungicida procloraz para el control de la antracnosis del mango, tanto en condiciones de campo como en postcosecha, ya que este fungicida presenta excelente actividad en frutos, mediante la eliminación de infecciones quiescentes. Además de que el riesgo de generar resistencia al procloraz, en aislados del complejo *C. gloeosporioides*, es bajo, en comparación con los fungicidas MBC.
- Se propone realizar análisis de secuencias del gen Citocromo *b* en aislados de *Colletotrichum* spp. con sensibilidad base y en aislados con diferente nivel de resistencia a fungicidas QoI. Esto con la finalidad de determinar si existen mutaciones de punto en este gen y en caso de que exista, conocer la relación entre el sitio de mutación y el nivel de sensibilidad que presentan dichos aislados.
- Se recomienda realizar programas de monitoreo de la resistencia a fungicidas en huertos comerciales de mango, con la finalidad de generar datos que ayuden a establecer estrategias para un uso racional y adecuado del control químico.