



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**  
**POSTGRADO EN FITOSANIDAD**  
**FITOPATOLOGÍA**

**COMPATIBILIDAD SEXUAL Y VEGETATIVA  
COMO EVIDENCIA EN LA SEPARACIÓN DE  
4 ESPECIES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO**  
*Colletotrichum*

**RAÚL ASael RODRÍGUEZ VILLARREAL**

**TESIS**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO  
2016

La presente tesis, titulada: **Compatibilidad sexual y vegetativa como evidencia en la separación de 4 especies filogenéticas del género *Colletotrichum***, realizada por el alumno: **Raúl Asael Rodríguez Villarreal**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD – FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:

  
\_\_\_\_\_  
**DR. DANIEL TÉLIZ ORTIZ**

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
**DR. JOSÉ ANTONIO MORA AGUILERA**

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
**DR. DANIEL NIETO ÁNGEL**

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
**DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo 2016.

# COMPATIBILIDAD SEXUAL Y VEGETATIVA COMO EVIDENCIA EN LA SEPARACIÓN DE 4 ESPECIES FILOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Colletotrichum*

RAÚL ASael RODRÍGUEZ VILLARREAL, MC.

Colegio de Postgraduados, 2016.

## RESUMEN

Desde la descripción y el establecimiento del género *Colletotrichum*, las bases en que se ha fundamentado la designación de sus especies han estado cambiando constantemente. El análisis de secuencias de diversos locus son utilizadas actualmente para la designación de especies filogenéticas crípticas dentro de especies complejas (clados). Es posible que las especies filogenéticas no se encuentren aisladas genéticamente y que pueda ocurrir entrecruzamiento entre ellas, generando poblaciones recombinantes que pudieran ser consideradas nuevas especies filogenéticas. En esta investigación se evaluó la capacidad de reproducción sexual y formación de heterocariones entre aislados de cuatro especies filogenéticas del clado gloeosporioides provenientes de mango (*Mangifera indica*). Se demostró que las especies filogenéticas *C. asianum*, *C. dianesei*, *C. fructicola* y *C. tropicale* son capaces de llevar a cabo reproducción sexual (*C. dianesei* con *C. asianum*, *C. tropicale* y *C. fructicola*) y ser compatibles vegetativamente (entre *C. dianesei*, *C. asianum*, y *C. fructicola*). Estos resultados sugieren que estas especies filogenéticas del clado gloeosporioides no están aisladas genéticamente y tienen la capacidad potencial de generar nuevas recombinantes genéticas entre ellas.

## PALABRAS CLAVE

Peritecio, mutantes *nit*, compatibilidad micelial, *Glomerella*.

**SEXUAL AND VEGETATIVE COMPATIBILITY AS EVIDENCE IN THE  
SEPARATION OF 4 PHYLOGENETIC SPECIES OF GENUS *Colletotrichum***

RAÚL ASael RODRÍGUEZ VILLARREAL, MC.

Colegio de Postgraduados, 2016.

ABSTRACT

Since the description and establishment of genus *Colletotrichum*, the basis on which is founded the designation of its species have been changing constantly. The analysis of sequences of many loci are currently used for the designation of cryptic phylogenetic species within complex species (clades). It is possible that the phylogenetic species are not genetically isolated and intercrossing could occur between them, generating recombinant populations that could be considered as new phylogenetic species. In this research, the ability of sexual reproduction and development of heterokaryons was evaluated between four phylogenetic species from the gloeosporioides clade isolated from mango (*Mangifera indica*). The phylogenetic species *C. asianum*, *C. dianesei*, *C. fructicola* and *C. tropicale* are able of sexual reproduction (*C. dianesei* with *C. asianum*, *C. tropicale* and *C. fructicola*) and to be vegetatively compatible (between *C. asianum*, *C. dianesei* and *C. fructicola*). These results suggest that these phylogenetic species of the gloeosporioides clade are not genetically isolated and they have the potential capacity to generate new genetic recombinants between them.

KEYWORDS

Perithecia, *nit* mutants, mycelial compatibility, *Glomerella*.

## AGRADECIMIENTOS

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

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad de realizar el posgrado en tan importante institución y por el conocimiento que me permitió adquirir.

Al Dr. Daniel Téliz Ortiz por sus consejos y su apoyo en mi formación académica y en el desarrollo de la presente investigación durante todo el tiempo que duró el posgrado.

Al Dr. José Antonio Mora Aguilera por todos los comentarios y observaciones realizadas hacia esta investigación.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir y al Dr. Daniel Nieto Ángel por el apoyo brindado durante el posgrado.

Al Dr. Cristian Nava Díaz, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto de investigación y mi formación académica.

A los compañeros y amigos con los que pasé un grato momento durante la realización del posgrado, ya fuese en los salones de clase, en las prácticas de laboratorio o durante el desarrollo de nuestros trabajos de investigación.

## DEDICATORIA

Especial dedicatoria a mis padres Raúl Rodríguez Guerra y Diana Esthela Villarreal Santos.

También dedicada a mis hermanos Rubén Israel Rdz. V. y Diana Nimrod Rdz. V.

## CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS _____	ix
ÍNDICE DE FIGURAS _____	x
INTRODUCCIÓN _____	1
REVISIÓN DE LITERATURA _____	4
1. Características generales de <i>Colletotrichum</i> _____	4
2. Designación de especies de <i>Colletotrichum</i> _____	5
2.1 Especies basadas en hospederos _____	6
2.2 Especies basadas en morfología _____	6
2.3 Especies basadas en filogenia _____	7
2.4 Especies biológicas en <i>Colletotrichum</i> _____	9
3. El ciclo parasexual _____	12
3.1 Formación de heterocariones en <i>Colletotrichum</i> _____	17
3.2 Desarrollo y utilización de mutantes <i>nit</i> en <i>Colletotrichum</i> _____	18
OBJETIVOS _____	22
HIPÓTESIS _____	23
MATERIALES Y MÉTODOS _____	24
Material biológico _____	24
Compatibilidad sexual y micelial _____	25
Obtención de mutantes <i>nit</i> _____	26
Pruebas de compatibilidad vegetativa _____	27

RESULTADOS	29
Compatibilidad sexual	29
Compatibilidad micelial	30
Compatibilidad vegetativa	29
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
LITERATURA CITADA	41



## ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
<b>Cuadro 1.</b> Crecimiento de mutantes deficientes en la utilización de nitrato en diferentes fuentes de nitrógeno (Brooker <i>et al.</i> , 1991). _____	19
<b>Cuadro 2.</b> Aislamientos de cuatro especies filogenéticas de <i>Colletotrichum</i> obtenidos de mango de diferentes estados de México utilizados en el presente estudio para realizar pruebas de compatibilidad sexual, micelial y vegetativa. _____	25
<b>Cuadro 3.</b> Compatibilidad sexual entre aislamientos de cuatro especies filogenéticas del clado gloeosporioides del género <i>Colletotrichum</i> , obtenidas de mango. _____	30
<b>Cuadro 4.</b> Compatibilidad micelial entre los aislamientos de diferentes especies filogenéticas. _____	33
<b>Cuadro 5.</b> Compatibilidad vegetativa entre aislamientos de tres especies de <i>Colletotrichum</i> del clado gloeosporioides obtenidas de mango _____	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

- Figura 1. Estructuras de *Colletotrichum*.** A. Acérvulos en lesión de hoja de naranja. B. Acérvulos con setas en hoja de zacate Jhonson. C-E. Conidios. F. Conidios germinados con apresorios. (Fotos de Raúl Asael Rodríguez Villarreal). \_\_\_\_\_ 4
- Figura 2. Síntomas causados por *Colletotrichum*.** A. Antracnosis en fresa. B. Antracnosis en banana. C. Antracnosis de la vaina de frijol. D. Antracnosis en berenjena. E. Tizón de las flores del mango. (Cannon *et al.*, 2012). \_\_\_\_\_ 5
- Figura 3. *Glomerella*, el estado telomorfo de *Colletotrichum*.** A-B. Peritecio (A), ascas y ascosporas (B) provenientes del telomorfo de *Glomerella lindemuthiana*. C-E. Peritecios (C, D), asca y ascosporas (E) provenientes de *Glomerella acutata*. F-G. Peritecio (F), asca y ascosporas (G) de *Glomerella glycines*. A-B, Rodríguez-Guerra, *et al.*, 2005; C-E, Guerber y Correll, 2001; F-G, Manandhar *et al.*, 1986. \_\_\_\_\_ 10
- Figura 4. Anastomosis en *Colletotrichum*.** A-D. Anastomosis entre hifas de dos cepas de *Colletotrichum lindemuthianum*. B y C son acercamientos de A. D es un evento de anastomosis distinto. E. Tubos de anastomosis entre conidios de *Colletotrichum lindemuthianum*. A-D, Rodríguez-Guerra *et al.*, 2004; E, Barcelos *et al.*, 2014. \_\_\_\_\_ 14
- Figura 5. Prueba de compatibilidad micelial en diferentes géneros.** A. Compatibilidad (C) e incompatibilidad (I) entre aislados de *Monosporascus cannonballus*. B, C. Compatibilidad (B) e incompatibilidad (C) entre aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*. D-F. Compatibilidad e incompatibilidad (flechas) entre aislados de *Sclerotium rolfsii*. G-I. Compatibilidad (flechas) e incompatibilidad (cabezas de flecha) entre aislados de *Fusarium graminearum* (fg) y *F. pseudograminearum* (fp). A, Bezerra *et al.*, 2013; B, C, Darshana *et al.*, 2014; D, E, F, Remesal *et al.*, 2012; G, H, I, Akinsanmi *et al.*, 2008. \_\_\_\_\_ 15

**Figura 6. Pruebas de compatibilidad vegetativa en diferentes géneros de hongos.** **A, B.** Compatibilidad entre mutantes de *Verticillium dahliae*. **C.** Compatibilidad e incompatibilidad entre mutantes de *Aspergillus flavus*. **D, E.** Compatibilidad (D) e incompatibilidad (E) entre mutantes de *Beauveria bassiana*. **F.** Compatibilidad e incompatibilidad en *Fusarium verticillioides*. **G.** Compatibilidad en *Magnaporthe grisea*. **H, I.** Compatibilidad (H, I) e incompatibilidad (I) en *Fusarium fujikuroi*. A, B, ElSharawy *et al.*, 2015; C, Bayman y Cotty, 1991; D, E, Castrillo *et al.*, 2004; F, Mohammadi *et al.*, 2012; G, Motallebi *et al.*, 2009; H, I, Zainuddin *et al.*, 2008. \_\_\_\_ 16

**Figura 7. Determinación de compatibilidad micelial.** **A-B.** Autocompatibilidad micelial en los aislados Cd7 (A) y Cd10 (B). **C.** Incompatibilidad micelial entre los aislamientos Cd7 (aislamiento en la parte superior) y Cd10 (aislamiento en la parte inferior) evidenciada por la presencia de una barrera oscura en la línea de contacto. \_\_\_\_ 31

**Figura 8. Compatibilidad vegetativa entre cepas probadoras.** Compatibilidad e incompatibilidad vegetativa en las confrontaciones entre Cf y Ca3 contra Cd6 y Cd8. \_ 34

## INTRODUCCIÓN

Desde la descripción y establecimiento del género *Colletotrichum*, ha cambiado la conformación de sus especies. En 1957 se tenían reportadas 700 especies de este género y Sutton en 1992 distinguió a varias especies como sinónimas, considerando sólo 39 especies en base a morfología. En las revisiones del género realizadas por Hyde *et al.* y Phoulivong, se propusieron 67 y 68 especies respectivamente, basándose en características morfológicas junto con secuencias espaciadoras transcritas internas (ITS) de los genes ribosomales. Sin embargo, se ha considerado que *Colletotrichum* cuenta con varios complejos de especies y que las secuencias ITS no permiten distinguir fácilmente las especies que los conforman (especies crípticas). Por lo anterior, nuevos análisis con diferentes marcadores moleculares han sido desarrollados para poder clasificar las especies en *Colletotrichum*, como el análisis filogenético multilocus, que utiliza locus de actina (ACT),  $\beta$ -Tubulina (TUB2), Calmodulina (CAL), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1  $\alpha$ ), además de ITS. Lo anterior ha llevado a determinar la ocurrencia de 113 especies de *Colletotrichum*.

Nuevas regiones de ADN, como el espaciador intergénico entre la DNA liasa y el locus de tipo de apareamiento MAT1-2 (*Apn2*/MAT-IGS) ha sido reportado en *Colletotrichum* para precisar la separación de especies. No obstante, al considerar un mayor número de loci en los estudios para delimitar especies, también debería reflejarse la diversidad genética natural de los organismos, lo que ocasiona la separación de más grupos y su propuesta como nuevas especies filogenéticas.

La compatibilidad sexual y vegetativa representan la capacidad de intercambio de información genética entre organismos relacionados, miembros de una misma especie

biológica. La compatibilidad sexual se caracteriza por la formación de estructuras reproductivas formadas por eventos de entrecruzamiento. La formación de heterocariones se caracteriza por la fusión de células somáticas y puede determinarse mediante pruebas de compatibilidad micelial en las que existe un continuo en el crecimiento de diferentes cepas confrontadas y pruebas de compatibilidad vegetativa mediante el uso de mutantes *nit* (auxotróficas, deficientes en la utilización de nitrato). Aunque una especie biológica es definida de forma diferente de una especie filogenética (grupo irreducible de organismos diagnosticablemente distinto de otros grupos y dentro del cual hay un patrón parental de ancestros y descendientes), en esta última es posible la ocurrencia de nuevos grupos que pueden ser producto del intercambio de información genética dentro de una especie biológica definida. Eventos de reproducción sexual y asexual son comunes en hongos y han sido ampliamente documentados en *Colletotrichum*. La ocurrencia de compatibilidad sexual entre clados filogenéticamente distintos se ha documentado en *C. acutatum*, representando la posibilidad de generar nuevas variantes capaces de incrementar el número de especies filogenéticas en clados de *Colletotrichum* con un complejo de especies.

En México se han reportado dos especies de *Colletotrichum* en mango, *C. gloeosporioides* mediante estudios morfológicos, de crecimiento y patogenicidad y *C. asianum* mediante análisis multilocus. Recientemente, aislamientos de *Colletotrichum* fueron obtenidos de áreas de producción de mango de México y fueron analizados mediante el locus *Apn2/MAT-IGS*, identificándose a las especies filogenéticas *C. tropicale*, *C. fructicola*, *C. asianum* y *C. dianesei* (Tovar-Pedraza, 2014; información pendiente de publicarse).

Aunque el análisis multilocus puede ser usado para reconocer especies filogenéticas de hongos y determinar su tipo de reproducción, es importante determinar mediante pruebas de

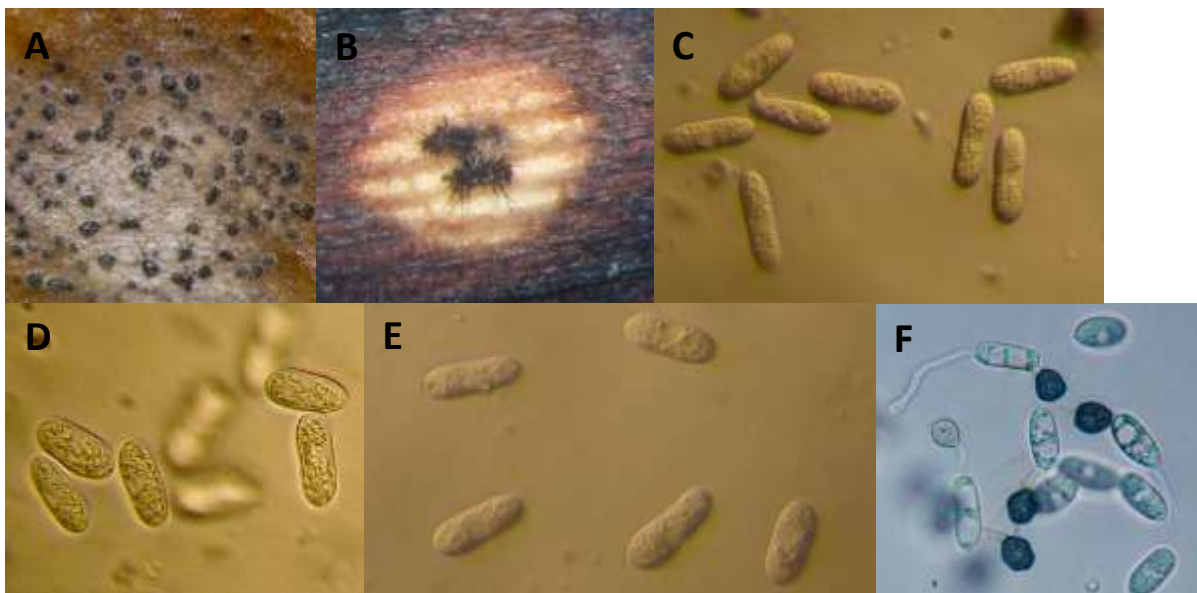
compatibilidad sexual y formación de heterocariones la posibilidad de recombinación genética entre individuos la cual pueda dar origen a nuevas variantes patogénicas e inclusive nuevas especies filogenéticas.

El objetivo de la presente investigación fue determinar la capacidad de intercambio de información genética mediante pruebas de compatibilidad sexual, micelial y vegetativa entre cuatro especies pertenecientes al clado gloeosporioides del género *Colletotrichum* aisladas de mango de diversas áreas productoras de México.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. Características generales de *Colletotrichum*

El género *Colletotrichum* se caracteriza morfológicamente por presentar acérvulos con o sin setas, conidios relativamente largos sin septos, falciformes o cilíndricos, y desarrolla apresorios (**Figura 1**); su estado teleomorfo es considerado dentro del género *Glomerella* (Hipocreales) según von Arx y Müller (1954). Este género contiene especies que atacan a una gran variedad de plantas de climas templados y tropicales, capaces de afectar diferentes partes de las plantas que incluye raíz, tubérculo, tallo, hoja, flor, fruto y semilla (Bailey *et al.*, 1992). La lesión o síntoma típico que causa es la antracnosis que consiste en lesiones necróticas delimitadas, en ocasiones hundidas y con un halo amarillo al rededor (Cannon *et al.*, 2012; **Figura 2**), aunque puede provocar otras enfermedades como la caída de flores en mango (Benítez-Camilo *et al.*, 2003), la caída del fruto en cítricos (Del Rivero, 1990) y la podredumbre de fruto en fresa (Merteley y Legard, 2004).



**Figura 1. Estructuras de *Colletotrichum*.** A. Acérvulos en lesión de hoja de naranja. B. Acérvulos con setas en hoja de zacate Jhonson. C-E. Conidios. F. Conidios germinados con apresorios. (Fotos de Raúl Asael Rodríguez Villarreal).

## 2. Designación de especies de *Colletotrichum*

La primera especie de *Colletotrichum* fue descrita como miembro de los géneros *Sphaeria* y *Vermicularia* desde los años 1801 y 1790 según Damm *et al.* (2009). De acuerdo a Cannon *et al.* (2012), Corda en 1831 introduce el género *Colletotrichum* para designar a *C. lineola*, la cual es la especie tipo del género. A partir de este último año, numerosas especies fueron designadas en el género *Colletotrichum* y hasta la actualidad el número y criterios para la identificación de especies ha cambiado.



**Figura 2. Síntomas causados por *Colletotrichum*.** A. Antracnosis en fresa. B. Antracnosis en banana. C. Antracnosis de la vaina de frijol. D. Antracnosis en berenjena. E. Tizón de las flores del mango (Cannon *et al.*, 2012).



## 2.1 Especies basadas en hospederos

A partir de la designación del género *Colletotrichum* por primera vez en 1831 por Corda, el criterio que era utilizado para reportar nuevas especies era en base al hospedero. Tan sólo entre 1880 y 1900, cincuenta especies de *Colletotrichum* fueron descritas aun sin una caracterización morfológica y sólo por encontrar un aislamiento infectando un género de planta previamente no reportado como hospedero. Hasta 1957 se llegó a encontrar reportadas alrededor de 750 especies de *Colletotrichum* (Cannon *et al.*, 2012). Incluso, especies como *C. dematium* y *C. lineola*, actualmente reconocidas en taxones distintos, fueron inicialmente consideradas como una sola especie (*C. dematium*) por sus conidios curvados (Damm *et al.*, 2009). Hoy en día, es reconocido que numerosas especies de *Colletotrichum* son capaces de atacar a diferentes especies y géneros de plantas hospederas.

## 2.2 Especies basadas en morfología

A pesar de la dificultad actual de establecer características morfológicas distintivas para ser utilizadas en la identificación de especies, Cannon *et al.* (2012) menciona que J. C. von Arx, basándose en características morfológicas, redujo a 11 especies las cerca de 750 especies de *Colletotrichum* reportadas hasta 1957. En ese estudio se consideró cerca de 600 especies como sinónimas de *C. gloeosporioides* (Cannon *et al.*, 2012) y 88 como sinónimas de *C. dematium* (Damm *et al.*, 2009).

En 1992, Sutton realizó una revisión de especies del género *Colletotrichum* y con base en morfología de conidios y apresorios, características de la colonia, setas y esclerocios, así como hospederos, encontró que varias especies compartían características similares, por lo

que las consideró como iguales. Como resultado de este estudio Sutton propuso que el género *Colletotrichum* fuera conformado por 39 especies.

Actualmente se considera que la identificación de las especies en este género es muy ambigua debido a que las características morfológicas que las distinguen son pocas, simples y muy variables (Cannon *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2009). Además de que el crecimiento en medio de cultivo no es constante y el estado teleomórfico raramente se forma (Freeman *et al.*, 2000; Latunde-Dada, 2001; Du *et al.*, 2005; Thaung, 2008).

### **2.3 Especies basadas en filogenia**

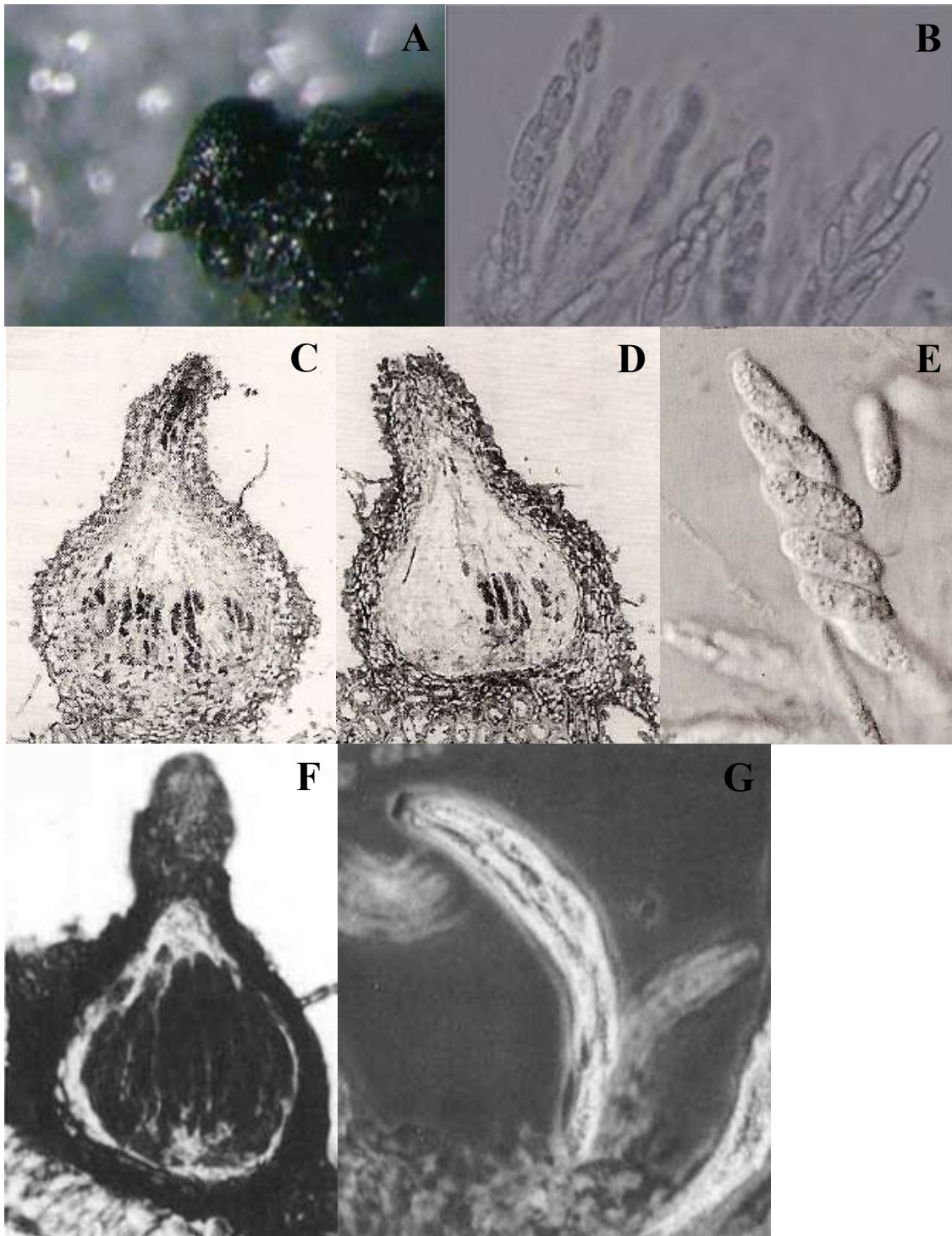
Con el desarrollo de las herramientas de la biología molecular y su potencial para el análisis del ADN, se desarrollaron números estudios dirigidos a establecer la variabilidad genética de especies de *Colletotrichum* (Masel *et al.*, 1993; Rodríguez-Guerra *et al.*, 2003; Rohana *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2010) y a determinar marcadores moleculares que permitieran identificar fácilmente especies en este género (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996; Mills *et al.*, 1992). Sin embargo, se encontró que existían diferencias en los marcadores moleculares de distintos aislamientos pertenecientes a las mismas morfoespecies. Debido esto, se empezó a considerar estos marcadores moleculares junto con las características morfológicas para la separación de especies del género *Colletotrichum*. Entre las secuencias de ADN más utilizadas en la identificación de hongos, se encuentran los espaciadores transcritos internos 1 y 2 (ITS1 e ITS2; Schoch *et al.*, 2012) que se encuentran flanqueando al gen ribosomal 5.8S.

En las revisiones del género realizadas por Hyde *et al.* (2009) y Phoulivong (2011) se han reconocido 67 y 68 especies del género *Colletotrichum* respectivamente, basándose en características morfológicas junto con secuencias de los ITS. Sin embargo, se ha considerado la posibilidad de que *Colletotrichum* cuente con especies crípticas (especies muy relacionadas y con características muy similares que dificulta su distinción), en donde las características morfológicas y las secuencias ITS no permiten separar fácilmente las especies que los conforman (Cannon *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012). A partir de este conocimiento, se han realizado estudios dedicados a encontrar formas por las cuales poder distinguir estas especies. Una de las estrategias más utilizadas en los últimos años para la diferenciación de las especies es el análisis multilocus, que somete diferentes secuencias concatenadas en un análisis filogenético (calcula de manera estadística la distancia evolutiva entre las secuencias), el cual ha permitido separar varias especies filogenéticas (especies determinadas por análisis filogenéticos) pertenecientes a una especie compleja (Huang *et al.*, 2013). Algunas de las secuencias utilizadas para el análisis multilocus son los genes de actina (ACT),  $\beta$ -Tubulina (TUB2), Calmodulina (CAL), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y el factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1  $\alpha$ ), junto con los espaciadores transcritos internos (ITS), con los cuales se proponen 113 especies en la revisión más reciente del género *Colletotrichum* realizada por Cannon *et al.* (2012). Con la utilización de los análisis multilocus y la integración de nuevos marcadores moleculares, surgen nuevas investigaciones en donde los aislamientos estudiados son agrupados dentro de las diferentes especies conocidas y aquellos aislamientos que no lo hacen son considerados como miembros de una nueva especie, la cual es propuesta, como en los trabajos de Huang *et al.* (2013) y Lima *et al.* (2013).

Actualmente, continúan los trabajos que usan y proponen nuevas regiones de ADN en los estudios del género *Colletotrichum* para la delimitación e identificación de especies filogenéticas, como el locus *Apn2/MAT* (Silva *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014). No obstante, al considerar un mayor número de secuencias nucleotídicas para realizar los estudios filogenéticos, también podremos ver reflejada la diversidad genética natural que presentan los organismos en estudio.

#### **2.4 Especies biológicas en *Colletotrichum***

Una especie biológica es aquella conformada por poblaciones cuyos individuos llevan a cabo entrecruzamiento natural por reproducción sexual y que están aislados reproductivamente de otras poblaciones (Mayden, 1997; Harrington and Rizzo, 1999). En el género *Colletotrichum* el uso de especies biológicas para delimitar éstas no ha sido utilizado, al igual que en otras especies de hongos, debido a la variabilidad de las poblaciones de especies designadas para llevar a cabo eventos de reproducción sexual. De las 39 especies consideradas por Sutton (1992), sólo en ocho se lleva a cabo la reproducción sexual, teniendo el estado teleomorfo en el género *Glomerella*. El estado teleomorfo consiste de peritecios, ascos y ascosporas (**Figura 3**).



**Figura 3.** *Glomerella*, el estado telomorfo de *Colletotrichum*. **A-B.** Peritecio (A), ascas y ascosporas (B) de *Glomerella lindemuthiana*. **C-E.** Peritecios (C, D), asca y ascosporas (E) de *Glomerella acutata*. **F-G.** Peritecio (F), asca y ascosporas (G) de *Glomerella glycines*. A, B, Rodríguez-Guerra, *et al.*, 2005; C, D, E, Guerber y Correll, 2001; F, G, Manandhar *et al.*, 1986.

Las especies que forman un estado teleomorfo pueden estar constituidas por aislamientos homotálicos (autofértiles, autocompatibles sexualmente; capaces de desarrollar un estado telomorfo sin la participación de otro aislamiento) y heterotálicos (autoestériles; autoincompatibles sexualmente; capaces de desarrollar un estado teleomorfo con la participación de otro aislamiento) como el caso de *C. graminicola* (Vaillancurt y Hanau, 1999), o pueden estar constituidas por aislamientos heterotálicos solamente como se ha considerado en *C. lindemuthianum* (Kimati y Galli, 1970; Batista y Chaves, 1982). En las especies de *Colletotrichum* que desarrollan un estado teleomorfo, los eventos de reproducción sexual pueden ser frecuentes entre aislamientos como en *C. graminicola* (Vaillancurt y Hanau, 1991) o pueden ser extremadamente raros como en *C. lindemuthianum* (Souza *et al.*, 2010) y *C. lentis* (Menat *et al.*, 2016). En *C. graminicola* y *C. lindemuthianum* es posible observar la producción errática de peritecios formados en las confrontaciones individuales en condiciones de laboratorio, e incluso la cantidad de peritecios formados en cada confrontación puede variar fuertemente (Vaillancurt y Hanau, 1991; Cisar *et al.*, 1994; Rodríguez-Guerra *et al.*, 2005).

Las pruebas que se realizan para determinar la capacidad de reproducción sexual en especies de *Colletotrichum* son diversas e incluyen la confrontación a distancia de aislamientos en cajas Petri conteniendo sólo medio de cultivo (Cisar *et al.*, 1994), o la combinación de tejido vegetal con grava (Vaillancurt y Hanau, 1991) o con medio de cultivo (Guerber y Correll, 2001). También se ha usado la combinación de conidios de aislamientos distintos sobre papel filtro colocado sobre medio de cultivo (Kimati y Galli, 1970).

Un aspecto importante en estudios referentes a la compatibilidad sexual entre poblaciones de *Colletotrichum* morfológicamente similares obtenidas de maíz y sorgo, es que

han permitido delimitar poblaciones de cada hospedero como especies distintas de *Colletotrichum* con base al aislamiento reproductivo entre ellas (Vaillancourt y Hanau, 1992). Sin embargo, mediante pruebas de compatibilidad sexual también se ha demostrado que poblaciones de *C. gloeosporioides* que infectan distintos hospederos tienen la capacidad de formar el teleomorfo (Cisar *et al.*, 1994), no así entre poblaciones del patógeno del mismo hospedero. Aunque Cisar *et al.* (1994) han demostrado la incapacidad de reproducción sexual entre distintas especies de *Colletotrichum* infectando diferentes hospederos, también Guerber *et al.* (2003) han encontrado que distintos clados filogenéticos de *C. acutatum* son capaces de reproducirse sexualmente. Lo anterior muestra la compleja variación de interacciones en pruebas de compatibilidad sexual que dificulta la denominación de especies biológicas y demuestra distintos niveles de aislamiento genético entre poblaciones de una misma especie de *Colletotrichum*.

### **3. El ciclo parasexual**

Así como la reproducción sexual, el ciclo parasexual en hongos representa otro mecanismo de recombinación genética (Pontecorvo, 1963; Cluterrbuck, 1996). Pontecorvo (1956) establece que el ciclo parasexual consiste en la formación de un heterocarión a partir de la fusión de dos núcleos haploides, la multiplicación del núcleo diploide heterocigoto junto con núcleos haploides parentales, una eventual formación de un micelio diploide homocariótico, el cruzamiento mitótico durante la multiplicación de núcleos diploides y la haplodización de núcleos diploides. Así, la formación de un heterocarión, que consiste en células conteniendo diferentes tipos de núcleos, debe formarse a través de la anastomosis de células y la mezcla de los citoplasmas de los organismos involucrados (Saupe, 2000), aunque

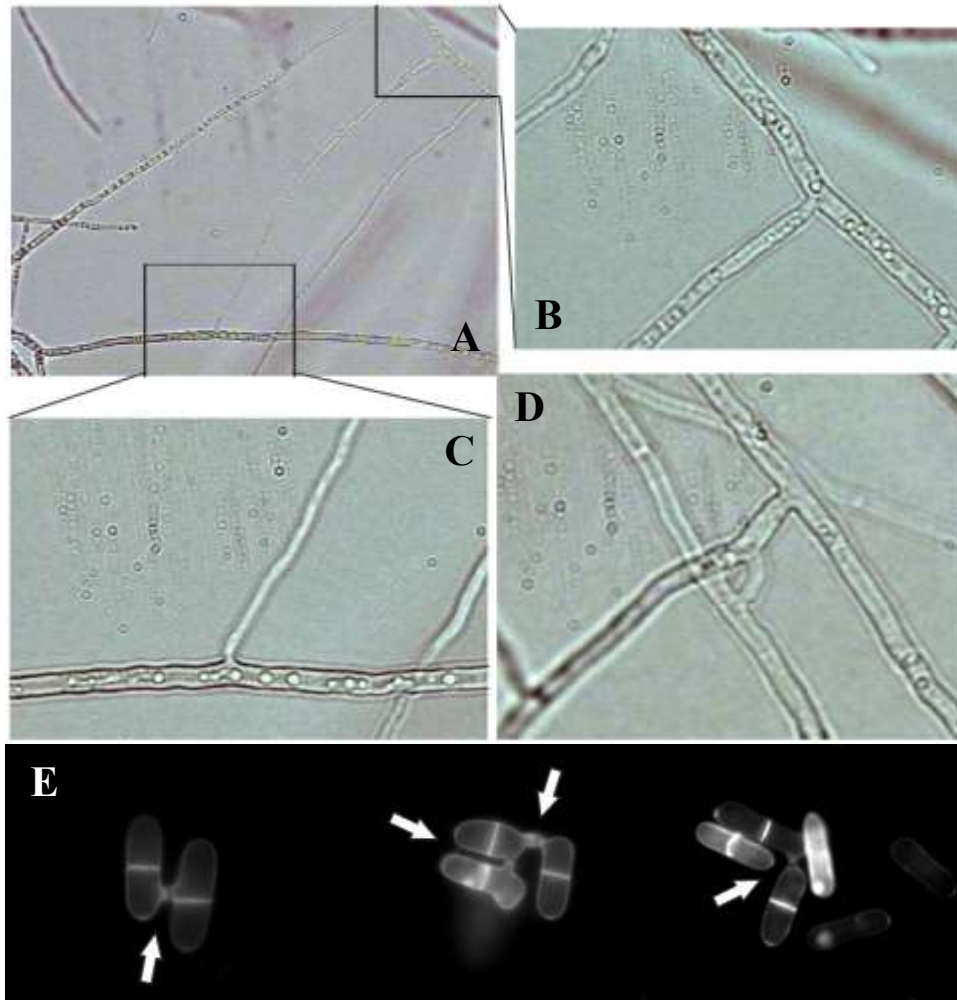
mutaciones espontaneas o inducidas en un aislamiento también pueden llevar a la ocurrencia de diferentes tipos de núcleos en las células (Tinline y MacNeil, 1969).

La formación de heterocariones entre dos aislamientos está gobernada por genes de incompatibilidad heterocariótica (*het*) o también llamados de incompatibilidad vegetativa (*vic*, por sus siglas en inglés). Cuando estos genes difieren entre aislamientos ocurre incompatibilidad entre ellos; mientras que cuando son similares los aislamientos son compatibles y capaces de formar un heterocarión viable (Glass y Kulda, 1992). Cuando aislamientos distintos son capaces de formar un heterocarión entre sí, se dice que estos pertenecen a un mismo grupo de compatibilidad.

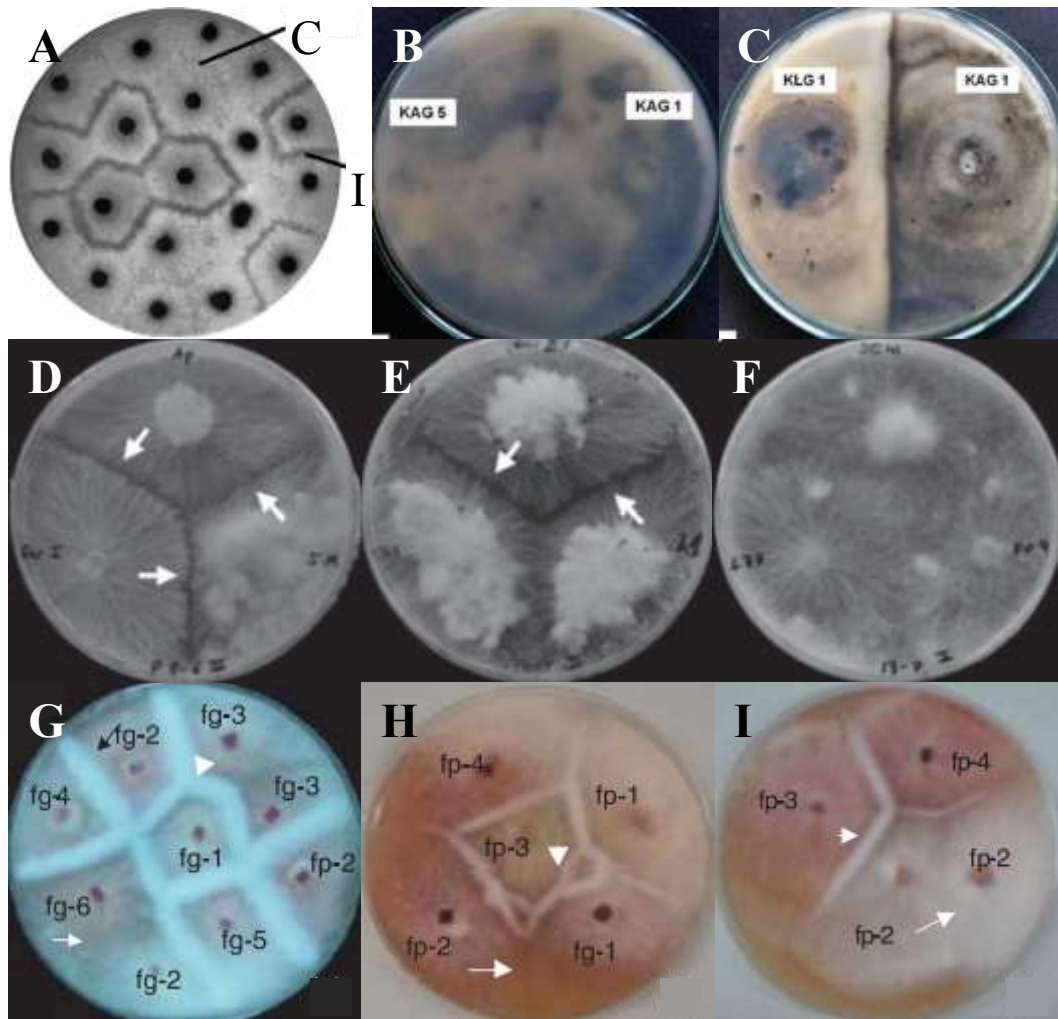
Tres pruebas principales han sido utilizadas para determinar la capacidad de formación de heterocariones entre aislamientos distintos en especies de hongos filamentosos. Una de ellas consiste en determinar directamente la formación de anastomosis (**Figura 4**) entre células hifales como es el caso de especies de *Rhizoctonia* (Bolkan y Ribeiro, 1985; Tuncer y Eken, 2013), en las que la viabilidad de células en anastomosis entre aislamientos distintos permite formar grupos de anastomosis. Una segunda prueba consiste en la ausencia de una barrera en la línea de contacto de las colonias de aislamientos confrontados en cajas Petri (**Figura 5**), como en *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium cepivorum* (Moreno y Acevedo, 2002; Shafer y Kohn, 2006), en donde el crecimiento continuo entre las colonias confrontadas permite formar grupos de compatibilidad micelial entre aislados distintos de una especie. La tercera prueba en hongos filamentosos es la complementación de mutantes auxotróficas deficientes en la utilización de nitrato como en los hongos *Fusarium oxysporum* (Correll *et al.*, 1987), *Botrytis cinerea* (Beever y Parkes, 2003), entre otros, que permite distinguir grupos de compatibilidad vegetativa entre aislamientos capaces de complementar su



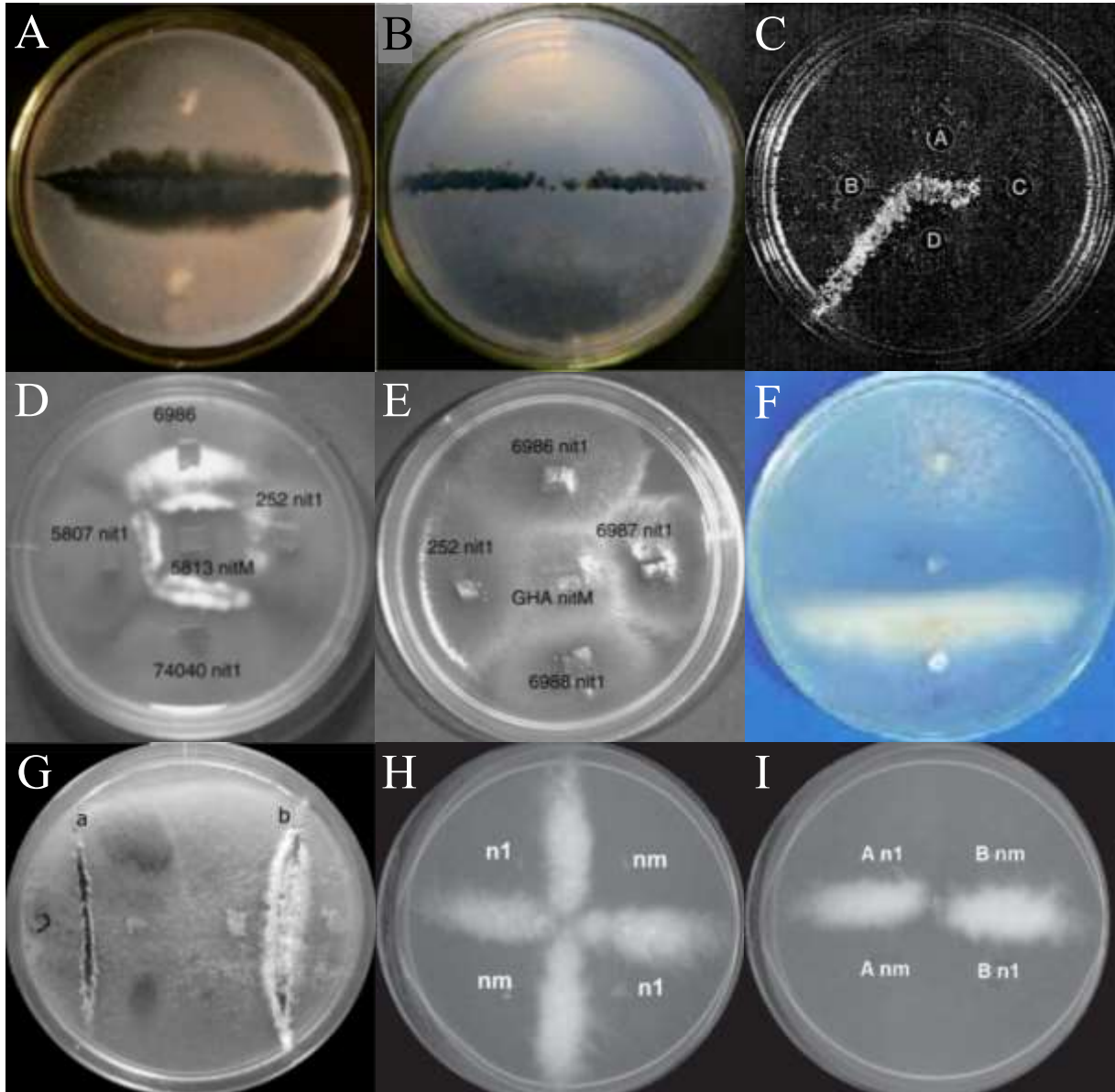
auxotrofia y crecer de manera como lo hacen los aislamientos parentales o silvestres (**Figura 6**). Esta última prueba es la más utilizada para establecer la compatibilidad entre aislamientos (Krnjaja *et al.*, 2013).



**Figura 4. Anastomosis en *Colletotrichum*.** A-D. Anastomosis entre hifas de dos cepas de *Colletotrichum lindemuthianum*. B y C son acercamientos de A. D es un evento de anastomosis distinto. E. Tubos de anastomosis entre conidios de *Colletotrichum lindemuthianum*. A-D, Rodríguez-Guerra *et al.*, 2004; E, Barcelos *et al.*, 2014.



**Figura 5. Prueba de compatibilidad micelial en diferentes géneros.** **A.** Compatibilidad (C) e incompatibilidad (I) entre aislados de *Monosporascus cannonballus*. **B, C.** Compatibilidad (B) e incompatibilidad (C) entre aislados de *Colletotrichum gloeosporioides*. **D-F.** Compatibilidad e incompatibilidad (flechas) entre aislados de *Sclerotium rolfsii*. **G-I.** Compatibilidad (flechas) e incompatibilidad (cabezas de flecha) entre aislados de *Fusarium graminearum* (fg) y *F. pseudograminearum* (fp). A, Bezerra *et al.*, 2013; B, C, Darshana *et al.*, 2014; D, E, F, Remesal *et al.*, 2012; G, H, I, Akinsanmi *et al.*, 2008.



**Figura 6. Pruebas de compatibilidad vegetativa en diferentes géneros de hongos. A, B.** Compatibilidad entre mutantes de *Verticillium dahliae*. **C.** Compatibilidad e incompatibilidad entre mutantes de *Aspergillus flavus*. **D, E.** Compatibilidad (D) e incompatibilidad (E) entre mutantes de *Beauveria bassiana*. **F.** Compatibilidad e incompatibilidad en *Fusarium verticillioides*. **G.** Compatibilidad en *Magnaporthe grisea*. **H, I.** Compatibilidad (H, I) e incompatibilidad (I) en *Fusarium fujikuroi*. A, B, ElSharawy *et al.*, 2015; C, Bayman y Cotty, 1991; D, E, Castrillo *et al.*, 2004; F, Mohammadi *et al.*, 2012; G, Motallebi *et al.*, 2009; H, I, Zainuddin *et al.*, 2008.

La formación de grupos de compatibilidad por cualquiera de las pruebas mencionadas permite establecer aislamientos que compartan secuencias idénticas en los loci *het* o *vic*, y cada grupo de aislamientos es incompatible con otros grupos de aislamientos de la especie bajo estudio. Además, la ocurrencia de grupos de compatibilidad puede mostrar la magnitud de la variabilidad genética en los hongos; mientras más grupos de compatibilidad existan en una especie, es señal de mayor diversidad genética en la especie, al menos en los loci involucrados en la compatibilidad (Glass y Kuldau, 1992; Krnjaja *et al.*, 2013). También, la presencia de grupos de compatibilidad restringe la transferencia de núcleos y mantiene el aislamiento genético entre ellos (Leslie, 1993).

### **3.1 Formación de heterocariones en *Colletotrichum*.**

En especies del género *Colletotrichum* se han utilizado estos tres tipos de pruebas. La identificación de grupos de anastomosis es quizás la prueba que más escasamente ha sido utilizada para determinar la diversidad de estos grupos en poblaciones de especies de *Colletotrichum*. En *C. lindemuthianum* se han identificado grupos de anastomosis entre aislamientos obtenidos de campos de producción de frijol (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2003), entre aislamientos de diferentes regiones geográficas (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2004) y entre aislamientos de origen desconocido (Carvalho *et al.*, 2011). Estos estudios han demostrado la gran variabilidad de grupos de anastomosis en esta especie. La anastomosis también ha sido observada entre conidios y se sugiere que este fenómeno puede jugar un papel en el ciclo de vida de *C. lindemuthianum* (Roca *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2012).

Al igual que la identificación de grupos de anastomosis la prueba de compatibilidad micelial ha sido escasamente utilizada para determinar la formación de heterocariones en

especies de *Colletotrichum*. Esta prueba se ha realizado en aislamientos de *C. lindemuthianum* por Pinto *et al.* (2012) entre 74 aislamientos del hongo, y entre nueve aislamientos de *C. gloeosporioides* por Darshana *et al.* (2014). Los resultados de estos autores mostraron que todos los aislamientos que probaron pertenecen a grupos de compatibilidad micelial distintos, lo que sugiere una gran variabilidad genética y aislamiento genético entre ellos en ambas especies.

Finalmente, el uso de mutantes auxotróficas deficientes en la utilización de nitrato (*nit*) han sido las más utilizadas para establecer la ocurrencia de compatibilidad vegetativa entre aislamientos en especies de *Colletotrichum*. Entre las especies que han sido analizadas por el uso de estas mutantes se encuentran *C. gloeosporioides* (Abang *et al.*, 2004; Chacko *et al.*, 1994), *C. coccodes* (Ben-Daniel *et al.*, 2010; Shcolnick *et al.*, 2007), *C. lindemuthianum* (Carvalho *et al.*, 2011; Barcelos *et al.*, 2011), *C. truncatum* (Sant'Anna *et al.*, 2010) y *C. kahawae* (Várzea *et al.*, 2002). Estos estudios han demostrado la ocurrencia desde el número reducido de grupos compatibles como se ha reportado en *C. kahawae* (Várzea *et al.*, 2002) hasta especies con grupos numerosos en *C. gloeosporioides* (Abang *et al.*, 2004). A pesar de las numerosas especies en el género *Colletotrichum* que han sido analizadas por la capacidad de formación de heterocariones entre sus poblaciones, sólo en *C. lindemuthianum* se ha encontrado la capacidad de generar nuevas variantes genéticas a partir de progenie obtenida de eventos de anastomosis (Rodríguez, 2002).

### **3.2 Desarrollo y utilización de mutantes *nit* en *Colletotrichum***

Para desarrollar la prueba de compatibilidad vegetativa mediante el uso de mutantes *nit*, es necesario obtenerlas a partir de aislamientos silvestres de interés. Estas mutantes

pueden ser de cuatro clases (*nit1*, *nit2*, Nit3 y NitM) según lo señala Brooker *et al.* (1991; **Cuadro 1**), quienes realizaron el primer reporte de mutantes *nit* y compatibilidad vegetativa en especies de *Colletotrichum*. Estos autores utilizaron dos medios de cultivo conteniendo clorato de potasio (1.5 %), a partir de los cuales fueron capaces de obtener sectores de rápido crecimiento delgado y con escaso micelio aéreo considerados mutantes. Para confirmar que estos sectores son mutantes deficientes en nitrato y estables, se transfieren a un medio de cultivo en donde la única fuente de nitrógeno es nitrato de sodio, en donde las mutantes crecen con un escaso micelio aéreo y delgado diferente al tipo silvestre (abundante micelio aéreo y denso). Si estos sectores son transferidos a un medio completo (Cove, 1966) conteniendo fuentes de nitrógeno adicionales, deben crecer de manera silvestre como el aislamiento que les dio origen.

**Cuadro 1.** Crecimiento de mutantes deficientes en la utilización de nitrato en diferentes fuentes de nitrógeno (Brooker *et al.*, 1991).

Tipo de Mutación	Nombre de la mutante	Fuentes de nitrógeno				
		Nitrato	Nitrito	Tartrato de amonio	Hipoxantina	Ácido úrico
Ninguna	Silvestre	+*	+	+	+	+
Locus estructural de la nitrato reductasa	<i>nit1</i>	-	+	+	+	+
Locus regulatorio mayor de nitrógeno	<i>nit2</i>	-	-	+	-	-
Locus regulatorio específico de la ruta	Nit3	-	-	+	+	+
Loci de cofactor de molibdeno	NitM	-	+	+	-	+

\* + = Crecimiento tipos silvestre; - = crecimiento variable delgado con escaso micelio aéreo.

Una vez identificadas las mutantes *nit* de un mismo aislamiento, estas son sometidas a crecer en medios de cultivo conteniendo cada uno una fuente de nitrógeno diferente, sobre los cuales el fenotipo de crecimiento en conjunto permite definir el tipo de mutación que llevan

(Cuadro 2). Una vez que se cuenta con las mutantes *nit* de cada aislamiento original, es necesario identificar parejas capaces de complementar sus deficiencias, las que se distinguen por crecer en forma silvestre en el sitio de contacto al ser confrontadas en medio conteniendo sólo nitrato de sodio como fuente de nitrógeno; estas mutantes complementarias comúnmente consisten en parejas de *nit1* con NitM y Nit3 con NitM. Aquellas parejas de mutantes que muestran este fenotipo en la línea de contacto entre ellas se dice que son complementarias y que el aislamiento original es un heterocarión autocompatible. Cuando no se identifican parejas de mutantes de un aislamiento original, capaces de crecer en forma silvestre en la línea de contacto, se considera que el aislamiento es un heterocarión autoincompatible (Brooker *et al.*, 1991). Lo anterior se basa en que los aislamientos silvestres u originales, al igual que las mutantes *nit* obtenidas de ellos, tienen la capacidad o no de tener anastomosis y formar o no heterocariones consigo mismos, lo único que los diferencia es su capacidad de adquisición de nitrógeno a partir de nitrato.

Si se confronta una mutante *nit1* con una mutante NitM, ambas provenientes del mismo aislamiento, es de esperarse que estos sean compatibles vegetativamente (desarrollen anastomosis y formación de heterocarión). Este micelio heterocariótico tendrá los núcleos de ambas mutantes, uno incapaz de codificar para la nitrato reductasa y otro incapaz de ensamblar el cofactor de molibdeno. Sin embargo, al estar ambos núcleos en el mismo micelio, las deficiencias de ambos se complementan, es decir, un núcleo será capaz de codificar la enzima nitrato reductasa y el otro de ensamblar el cofactor de molibdeno. Entonces, el micelio heterocariótico tendrá la maquinaria bioquímica necesaria para poder reducir el nitrato en nitrito, lo que le permitirá al hongo asimilar y utilizar el nitrógeno y así

este micelio presentará un fenotipo silvestre. La capacidad de formar un heterocarión entre distintos aislamientos usando las mutantes *nit* debe permitir agruparlos como miembros de un grupo de compatibilidad vegetativa. Aislamientos incapaces de formar un heterocarión, son considerados miembros de diferentes grupos de compatibilidad vegetativa.



## **OBJETIVO**

El objetivo de la presente investigación fue determinar la capacidad de intercambio de información genética mediante pruebas de compatibilidad sexual, micelial y vegetativa entre cuatro especies pertenecientes al clado gloeosporioides del género *Colletotrichum* aisladas de mango de diversas áreas productoras de México.

## **HIPÓTESIS**

Considerando la descripción de especies filogenéticas como parte de una especie compleja, es posible que existan aislamientos capaces de compartir algún grupo de compatibilidad vegetativa o sexual entre ellas, sugiriendo la posibilidad de formar nuevas poblaciones genéticamente distintas a las especies filogenéticas involucradas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Los aislamientos del género *Colletotrichum* incluidos en este estudio provienen de huertos comerciales de mango de los estados de Chiapas, Nayarit, Veracruz, Colima, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa en México (**Cuadro 1**) y fueron proporcionados por el Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados. Los aislamientos fueron identificados previamente como *C. asianum*, *C. dianesei*, *C. fructicola* y *C. tropicale* (Tovar-Pedraza, 2014; información pendiente de publicarse) en base al marcador molecular *Apn2/MAT* (Silva *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014). Adicionalmente se utilizó un aislamiento de *Colletotrichum* sp. (Co-04) obtenido de hojas de anacua (*Ehretia anacua*), facilitado por el Dr. Raúl Rodríguez Guerra del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) caracterizada mediante ITSs (accesión en GenBank JQ658856) y que no muestra relación filogenética con el clado gloeosporioides (datos no publicados).

Los aislamientos se encuentran conservados en el laboratorio de fitopatología del INIFAP, en el Campo Experimental General Terán y en el Posgrado de Fitosanidad – Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos.

Los aislamientos se mantuvieron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA marca Difco) durante la investigación.

**Cuadro 2.** Aislamientos de cuatro especies filogenéticas de *Colletotrichum* obtenidos de mango de diferentes estados de México utilizados en el presente estudio para realizar pruebas de compatibilidad sexual, micelial y vegetativa.

Especie	Clave en este estudio	Clave según fuente	Origen	Tejido de origen
<i>C. asianum</i>	Ca1	M 8-2	Nueva Italia, Michoacán	Hoja
	Ca2	V 9-1	Tierra blanca, Veracruz	Rama
	Ca3	Ch 12-1	Tapachula, Chiapas	Fruto
	Ca4	N 4-1	Tepic, Nayarit	Hoja
	Ca5	N 8-3	Tepic Nayarit	Hoja
	Ca6	M 15-2	Nuevo Urecho, Michoacán	Hoja
<i>C. dianesei</i>	Cd1	G 12-1	Cuajinicuilapa, Guerrero	Hoja
	Cd2	Oax 6-3	Zanatepec, Oaxaca	Hoja
	Cd3	Sin 1-3	Ahome, Sinaloa	Hoja
	Cd4	Sin 2-1	Ahome, Sinaloa	Hoja
	Cd5	Sin 4-1	Ahome, Sinaloa	Hoja
	Cd6	V 8-1	Tierra blanca, Veracruz	Hoja
	Cd7	Ch 6-1	Tuxtla Chico, Chiapas	Fruto
	Cd8	Col 2-3	Armería, Colima	Hoja
	Cd9	Col 3-1	Armería, Colima	Hoja
	Cd10	G 10-2	Tecpan de Galeana, Guerrero	Hoja
	Cd11	M 2-2	Parácuaro, Michoacán	Hoja
	Cd12	V 1-3	Puente Nacional, Veracruz	Hoja
	Cd13	M 10-1	Nueva Italia, Michoacán	Hoja
	Cd14	M 11-2	Nueva Italia, Michoacán	Hoja
	Cd15	Oax 5-2	Zanatepec, Oaxaca	Hoja
<i>C. fructicola</i>	Cf	Ch 20-3	Metapa de Domínguez, Chiapas	Rama
<i>C. tropicale</i>	Ct	Ch 8-2	Ciudad Hidalgo, Chiapas	Rama

### Compatibilidad sexual y micelial

Se realizaron confrontaciones por triplicado entre los aislamientos de las cuatro especies filogenéticas del clado gloeosporioides para determinar su capacidad de reproducción sexual. Además, la cepa Co-04 se utilizó como especie externa al clado gloeosporioides. Las confrontaciones se realizaron en cajas Petri conteniendo papa dextrosa agar (PDA). En cada caja se transfirieron fragmentos de 5 mm<sup>2</sup> a una distancia de 2.7 cm entre ellos a partir de

colonias de 10 días de crecimiento en PDA y se incubaron a 25 °C en oscuridad por 30 días. Cada aislamiento también fue confrontado consigo mismo (Cisar *et al.*, 1994).

Bajo un microscopio estereoscópico se exploró la línea de contacto del micelio desarrollado por ambos fragmentos en busca de peritecios. Tres categorías de evaluación se establecieron: (1) ausencia de peritecios, (2) presencia de peritecios inmaduros y (3) la presencia de peritecios maduros con ascos y ascosporas. Además de evaluar la compatibilidad sexual, también se determinó la compatibilidad micelial entre aislamientos de manera similar a lo reportado por Darshana *et al.* (2014). Se observó la línea de contacto del crecimiento de las colonias confrontadas por la parte inferior de las cajas Petri y se registró su respuesta utilizando las siguientes tres categorías: (1) ausencia de una barrera de color oscuro, (2) una barrera de color oscuro tenue y (3) presencia de una barrera de color oscuro intenso. La ocurrencia de la categoría 1 en las tres repeticiones entre las colonias confrontadas se consideró como compatibilidad micelial, mientras la ocurrencia de la categoría 2 y 3 en al menos una de las tres repeticiones se consideró que los aislados confrontados fueron incompatibles micelialmente debido a la muerte y oscurecimiento de las hifas en contacto.

### **Obtención de mutantes *nit***

Se desarrollaron mutantes *nit* de aislamientos compatibles e incompatibles micelialmente para determinar su capacidad de formar o no un heterocarión mediante la prueba de compatibilidad vegetativa (Brooker *et al.*, 1991).

Los aislamientos bajo estudio de *Colletotrichum* spp. se inocularon en cajas Petri conteniendo medio basal [MB; 30 g de sacarosa, 2 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.5 g de KCl, 10 mg de FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 20 gramos de agar y 0.2 mL de solución

de elementos traza (5 g de ácido cítrico, 5 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 50 mg  $\text{H}_3\text{BO}_4$  y 50 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 95 mL) en 1 litro de agua] y se incubaron por 10 días (Brooker *et al.*, 1991).

Tres fragmentos (5 mm<sup>2</sup>) de las colonias desarrolladas en MB se transfirieron a 10 cajas Petri con MB más 1.6 g de L-asparagina (disuelta en 20 mL de agua estéril, esterilizada por filtración e incorporada antes de vaciar a cajas Petri) y 25 g de  $\text{KClO}_3$  por litro. Las cajas Petri se incubaron hasta por 6 semanas y se revisaron cada tercer día. Hifas de sectores con rápido crecimiento y escaso micelio aéreo se transfirieron a MB (Brooker *et al.*, 1991). Las nuevas colonias desarrolladas en MB con escaso o nulo crecimiento aéreo se consideraron mutantes *nit*, como se ha referido por otros autores (Barcelos *et al.*, 2011; Carvalho y Mendes-Costa, 2011; Krnjaja *et al.*, 2013).

### **Pruebas de compatibilidad vegetativa**

Confrontaciones entre mutantes obtenidas de cada aislamiento se realizaron en MB en cajas Petri de 60 X 60. Aquellas parejas de mutantes que desarrollaron un crecimiento tipo silvestre (abundante micelio aéreo) en la línea de contacto, se consideraron complementarias en sus mutaciones y fueron seleccionados dos pares de mutantes por cada aislamiento (cepas mutantes probadoras) para realizar las confrontaciones antes mencionadas. Posteriormente, las mutantes probadoras obtenidas de los aislamientos de las distintas especies filogenéticas de *Colletotrichum*, fueron confrontadas entre ellas (Brooker *et al.*, 1991).

La ocurrencia de crecimiento tipo silvestre en la línea de contacto en al menos una confrontación entre mutantes de diferentes aislados se consideró como evidencia de la

formación de un heterocarión entre ellos y por lo tanto miembros de un mismo grupo de compatibilidad vegetativa (Leslie, 1993).

## RESULTADOS

### Compatibilidad sexual y micelial

A partir de 300 confrontaciones realizadas para determinar la compatibilidad sexual y micelial entre 23 aislamientos de *Colletotrichum* del clado gloeosporioides aislados de mango (**Cuadro 1**), incluyendo el aislamiento Co-04, se observaron respuestas de compatibilidad e incompatibilidad (**Cuadro 2**). Todos los aislamientos confrontados consigo mismos fueron autoincompatibles sexualmente incapaces de desarrollar peritecios. El aislamiento Co-04 de anacua fue incompatible sexualmente con todos los aislados del clado gloeosporioides de mango. Sólo el 0.66 % (Ca2 con Cd3 y Cd3 con Cd4) de las confrontaciones desarrollaron peritecios con ascos y ascosporas en al menos una de las repeticiones entre *C. asianum* (Ca2) con *C. dianesei* (Cd3) y dos aislados de esta última especie (Cd3 con Cd4). Otro 2.0 % de las confrontaciones de los aislados de mango (Cd1 con Ct, Cd1 con Cf, Cd1 con Cd2, Cd1 con Cd5, Cd1 con Cd6 y Ca1 con Cd6) desarrollaron peritecios sin ascos ni ascosporas e involucraron aislados de las cuatro especies filogenéticas. Estos resultados muestran la pobre capacidad de aislados de *Colletotrichum* del clado gloeosporioides aislados de mango para ser compatibles sexualmente. El 97.34 % de las confrontaciones entre aislamientos fueron incompatibles.



**Cuadro 3.** Compatibilidad sexual entre aislamientos de cuatro especies filogenéticas del clado gloeosporioides del género *Colletotrichum*, obtenidas de mango.

	Ct <sup>a</sup>	Cf	Ca1	Ca2	Cd1	Cd2	Cd3	Cd4	Cd5	Cd6	Co-04
Ct	1,1,1 <sup>bc</sup>										
Cf	1,1,1	1,1,1									
Ca1	1,1,1	1,1,1	1,1,1								
Ca2	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1							
Cd1	2,2,2 <sup>d</sup>	2,2,2	1,1,1	1,1,1	1,1,1						
Cd2	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,2,2	1,1,1					
Cd3	1,1,1	1,1,1	1,1,1	3,2,3	1,1,1	1,1,1	1,1,1				
Cd4	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,3,2	1,1,1			
Cd5	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	2,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1		
Cd6	1,1,1	1,1,1	2,2,2	1,1,1	1,2,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	
Co-04	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1	1,1,1

<sup>a</sup> Ct= *C. tropicale*, Cf= *C. fructicola*, Cd= *C. dianesei*, Ca= *C. asianum*.

<sup>b</sup> 1= Ausencia de peritecios, 2= presencia de peritecios inmaduros, 3= presencia de peritecios maduros con ascos y ascosporas.

<sup>c</sup> Zonas sombreadas son las confrontaciones entre individuos de la misma especie.

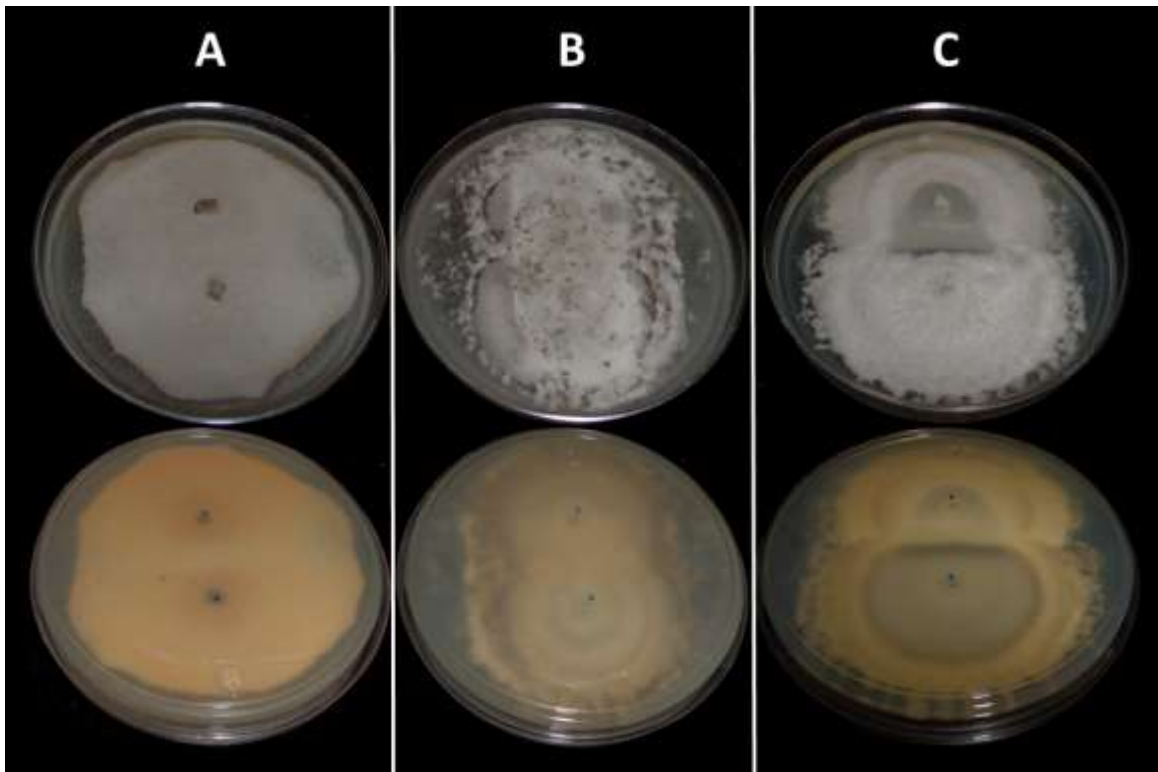
<sup>d</sup> Celdas con margen oscuro = confrontaciones con peritecios maduros o inmaduros.

### Compatibilidad micelial

La evaluación de compatibilidad micelial mostró más confrontaciones compatibles (25.95 %) respecto al número de confrontaciones compatibles sexualmente (2 %) entre los aislamientos. Además, entre aislamientos se identificaron confrontaciones en donde claramente se formó la barrera de incompatibilidad (**Figura 7**) en comparación con otras en la que ésta no ocurrió (**Cuadro 4**).

Todos los aislamientos fueron auto compatibles micelialmente, con excepción de tres aislamientos de *C. dianesei* de los cuales no se contó con datos por eventos de contaminación. El aislamiento Co-04 mostró ser incompatible con 21 aislamientos de mango y el aislamiento de *C. tropicale* junto con el aislamiento Cd3 de *C. dianesei* fueron incompatibles micelialmente con todos los aislamientos confrontados. Mientras que el aislamiento de *C.*

*fructicola* mostró compatibilidad micelial con un aislamiento de *C. asianum* (Ca5) y ocho de *C. dianesei* (Cd4, Cd5, Cd6, Cd7, Cd8, Cd9, Cd11, Cd13). Sólo entre los aislamientos de *C. asianum* ocurrieron cuatro confrontaciones compatibles y 11 incompatibles y entre aislamientos de *C. dianesei* se encontraron 20 y 80 confrontaciones compatibles e incompatibles, respectivamente. Finalmente, la confrontación entre *C. asianum* y *C. dianesei* mostró 20 y 69 confrontaciones compatibles e incompatibles, respectivamente. Los aislamientos que fueron compatibles entre ellos fueron incapaces de formar grupos de compatibilidad micelial bien definidos.



**Figura 7. Determinación de compatibilidad micelial.** A-B. Autocompatibilidad micelial en los aislados Cd7 (A) y Cd10 (B). C. Incompatibilidad micelial entre los aislamientos Cd7 (aislamiento en la parte superior) y Cd10 (aislamiento en la parte inferior) evidenciada por la presencia de una barrera oscura en la línea de contacto.

## Compatibilidad vegetativa

En la prueba de compatibilidad vegetativa, las confrontaciones realizadas entre mutantes *nit* complementarias de cada aislamiento mostraron que todas son autocompatibles vegetativamente, de igual manera que ocurrió entre mutantes de *C. fructicola* (Cf) con *C. asianum* (Ca4) (**Figura 8**) y *C. dianesei* (Cd6, Cd8, Cd9) (**Cuadro 5**). La confrontación del aislamiento Ca3 de *C. asianum* con el aislamiento Ca4 de la misma especie y con Cd8 de *C. dianesei* fue de incompatibilidad, mientras que con Cd6 y Cd9 de esta última especie fue compatible vegetativamente. Lo anterior muestra la posibilidad de intercambio genético mediante la formación de heterocariones entre especies del clado gloeosporioides obtenidos de mango. Esta prueba mostró una fuerte concordancia con las pruebas de compatibilidad micelial, con excepción de la confrontación entre el aislamiento de *C. fructicola* (Cf) con Ca4 de *C. asianum* que difieren en ambas pruebas (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4.** Compatibilidad micelial entre los aislamientos de diferentes especies filogenéticas.

	Ct <sup>a</sup>	Cf	Ca 1	Ca 2	Ca 3	Ca 4	Ca 5	Ca 6	Cd 1	Cd 2	Cd 3	Cd 4	Cd 5	Cd 6	Cd 7	Cd 8	Cd 9	Cd 10	Cd 11	Cd 12	Cd 13	Cd 14	Cd 15	Co-04
Ct	C <sup>bc</sup>																							
Cf	I	C																						
Ca1	I	I	C																					
Ca2	I	I	I	C																				
Ca3	I	I	C	C	C																			
Ca4	I	I	C	I	I	C																		
Ca5	I	C	I	I	I	I	C																	
Ca6	I	I	C	I	I	I	I	C																
Cd1	I	I	C	I	C	C	I	I	C															
Cd2	I	I	I	I	I	I	I	C	C	C														
Cd3	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	*													
Cd4	I	C	C	I	C	I	I	C	C	C	I	C												
Cd5	I	C	C	I	I	I	C	I	I	C	*	C	C											
Cd6	I	C	C	C	C	I	*	I	I	I	I	I	I	C										
Cd7	I	C	I	I	C	I	I	I	I	C	I	I	I	I	C									
Cd8	I	C	I	I	I	I	I	I	C	I	I	I	I	I	I	C								
Cd9	I	C	I	I	C	C	I	C	I	I	I	I	I	I	I	I	*							
Cd10	I	I	I	I	I	I	C	I	I	I	I	I	I	I	I	I	C	C						
Cd11	I	C	C	I	I	C	C	I	C	I	I	C	*	*	C	C	I	I	C					
Cd12	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	C	I	I	I	I	C				
Cd13	I	C	I	I	I	I	I	I	C	I	I	I	I	I	I	I	C	I	*	I	*			
Cd14	I	I	I	I	I	I	I	I	I	C	I	I	I	I	I	I	I	C	I	C	I	C		
Cd15	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	C	I	*	I	I	I	I	I	C	I	I	C	
Co-04	I	I	I	I	I	I	I	*	I	I	I	*	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	C

<sup>a</sup> Ct = *C. tropicale*, Cf = *C. fruticola*, Ca = *C. asianum*, Cd = *C. dianesei*.

<sup>b</sup> C= Compatible, I= Incompatible, \*= no se tiene dato.

<sup>c</sup> Celdas sombreadas son las confrontaciones entre individuos de la misma especie.

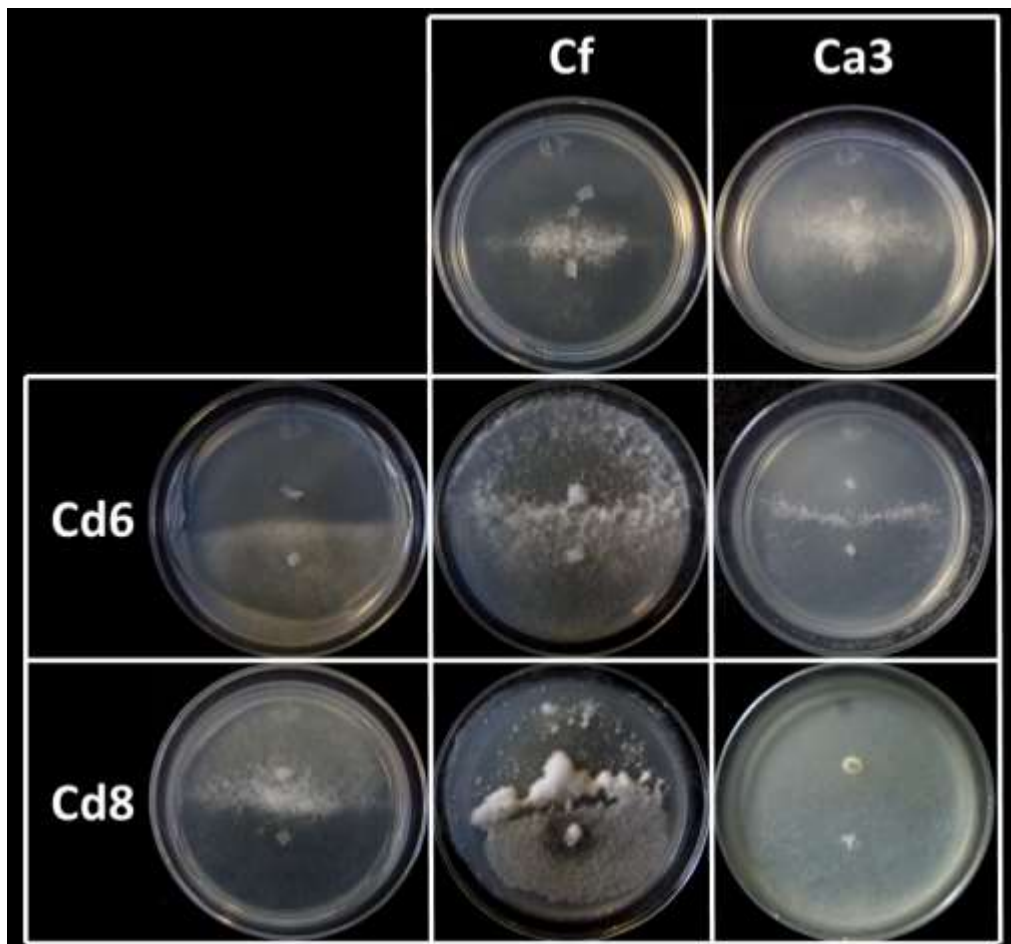
**Cuadro 5.** Compatibilidad vegetativa entre aislamientos de tres especies de *Colletotrichum* del clado gloeosporioides obtenidas de mango.

	Cf <sup>a</sup>	Ca4	Ca3	Ca6	Cd6	Cd8	Cd9	Cd12
Cf	1 <sup>bc</sup>							
Ca4	1	1						
Ca3	1	3	1					
Ca6	1	1	*	1				
Cd6	1	1	1	1	1			
Cd8	1	1	1	1	1	1		
Cd9	1	1	1	1	*	1	1	
Cd12	2	1	1	1	*	1	1	1

<sup>a</sup> Cf= *C. fructicola*, Ca= *C. asianum*, Cd= *C. dianesei*.

<sup>b</sup> 1= Ocurrencia de compatibilidad vegetativa, 2= ocurrencia de compatibilidad vegetativa débil, 3= ausencia de compatibilidad vegetativa y \*= confrontación no realizada.

<sup>c</sup> Zonas sombreadas son las confrontaciones entre individuos de la misma especie.



**Figura 8.** Compatibilidad vegetativa entre cepas probadoras. Compatibilidad e incompatibilidad vegetativa en las confrontaciones entre Cf y Ca3 contra Cd6 y Cd8.

## DISCUSIÓN

### Compatibilidad sexual

En este estudio se demuestra que especies filogenéticas, designadas mediante el análisis del locus *Apn2/MAT-IGS*, del clado gloeosporioides del género *Colletotrichum*, aisladas de mango, tienen compatibilidad sexual y vegetativa (mediante pruebas de compatibilidad micelial y uso de mutantes *nit*). La ocurrencia de compatibilidad sexual entre aislados de especies de *Colletotrichum* ha sido ampliamente documentada principalmente en estudios realizados en laboratorio y se considera que es frecuente la ocurrencia del estado sexual en especies del clado gloeosporioides (Cannon *et al.*, 2012). En el presente estudio, todos los aislamientos de las cuatro especies filogenéticas (*C. tropicale*, *C. fructicola*, *C. asianum*, *C. dianesei*) fueron autoincompatibles sexualmente y sólo se identificaron entre las 300 confrontaciones dos pares (0.66 %) de aislamientos sexualmente compatibles, uno entre aislamientos de *C. dianesei* y uno más entre *C. dianesei* y *C. asianum*. El desarrollo de peritecios con ascos y ascosporas entre Ca2 con Cd3 y Cd3 con Cd4 indica su capacidad heterotálica y es aceptado como evidencia de intercambio de información genética entre poblaciones de una misma especie biológica (Souza *et al.*, 2010).

La baja frecuencia de cepas compatibles sexualmente aquí observada es similar a la reportada por Behnia *et al.* (2016), quienes reportaron que el 0.98 % de las confrontaciones entre 51 aislamientos de *C. gloeosporioides* obtenidos de cítricos fueron sexualmente compatibles. También, se ha reportado que aislamientos de *C. gloeosporioides* obtenidos de una misma especie hospedera pueden ser incapaces de reproducirse sexualmente entre sí, mientras que esto puede ocurrir frecuentemente entre aislamientos provenientes de diferentes especies hospederas (Cisar *et al.*, 1994).

La ocurrencia de compatibilidad sexual entre especies filogenéticas del clado gloeosporioides obtenidas de mango, es similar a lo reportado entre clados filogenéticamente distintos de *C. acutatum sensu lato* (Guerber *et al.*, 2003) y sugiere que es posible la formación de poblaciones recombinantes capaces de incrementar la diversidad dentro del clado gloeosporioides. La formación de protoperitecios observada en seis confrontaciones sugiere que los aislamientos involucrados son capaces de iniciar un proceso de reproducción sexual sin ser capaces de concluir la formación de peritecios maduros con ascos y ascosporas *in vitro* en este estudio. Estas estructuras también han sido observadas entre aislamientos de especies como *C. lindemuthianum* (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2012) y *C. acutatum* (Guerber *et al.*, 2003). Nuestros resultados demuestran una baja frecuencia de aislamientos compatibles sexualmente, obtenidos de mango de diferentes estados productores de México, sugiriendo una fuerte barrera sexual entre las especies filogenéticas estudiadas.

### **Compatibilidad micelial**

Las pruebas para determinar la capacidad de intercambio de información genética mediante la fusión de células somáticas en hongos incluyen la formación de anastomosis observada en *Rhizoctonia solani* y *C. lindemuthianum* formando grupos de anastomosis (Sneh *et al.*, 1991; Rodríguez-Guerra *et al.*, 2004), la formación macroscópica de crecimiento silvestre entre mutantes auxotróficas complementarias en numerosas especies de hongos formando grupos de compatibilidad vegetativa (Beever *et al.*, 1995; McCallum *et al.*, 2004; Ben-Daniel *et al.*, 2010; Carvalho y Mendes-Costa, 2011) y la ausencia macroscópica de una barrera entre colonias silvestres formando grupos de compatibilidad micelial como en *Sclerotinia sclerotiorum* (Irani *et al.*, 2011; Barari *et al.*, 2014) y *Sclerotium rolfsii* (Remesal

*et al.*, 2012). Esta última prueba ha sido escasamente utilizada en el género *Colletotrichum* y al igual que en aislamientos de *C. gloeosporioides* obtenidos de jengibre de diferente origen (Darshana *et al.*, 2014), dentro y entre los aislamientos de *C. tropicale*, *C. fructicola*, *C. asianum* y *C. dianesei* usados en esta investigación no se observaron grupos discretos compatibles micelialmente. De las 300 confrontaciones realizadas entre aislamientos, 75 (25.95 %) fueron compatibles micelialmente, un porcentaje bajo respecto al 66.67 % observado por Darshana *et al.* (2014). Nuestros resultados demuestran que es frecuente la ocurrencia de compatibilidad micelial entre tres especies del clado gloeosporioides de *Colletotrichum* obtenidas de mango de diferente origen y que esta prueba puede ser utilizada extensivamente en estudios de relaciones genéticas y flujo genético entre especies filogenéticas de *Colletotrichum*.

### **Compatibilidad vegetativa**

Aquí mostramos una fuerte concordancia entre las pruebas de compatibilidad micelial y vegetativa entre aislamientos de especies de *C. fructicola*, *C. asianum* y *C. dianesei*, con excepción de la confrontación entre *C. fructicola* y el aislamiento Ca4 de *C. asianum* para lo cual no tenemos una explicación. La compatibilidad vegetativa ha sido ampliamente documentada en diversas especies de *Colletotrichum* (Heilmann *et al.*, 2006; Barcelos *et al.*, 2011; Salman *et al.*, 2014) e involucra la formación de heterocariones capaces de generar nuevas poblaciones con características comunes (Leslie, 1993). Estudios dirigidos a demostrar que pruebas de compatibilidad micelial permiten distinguir los mismos grupos de compatibilidad vegetativa son escasos, como el realizado por McCallum *et al.* (2004) con aislamientos de *Fusarium graminearum*. A pesar que las pruebas de compatibilidad micelial



son menos laboriosas y consumidoras de tiempo, nuevas estrategias están siendo desarrolladas y evaluadas para la identificación de grupos de compatibilidad vegetativa en *C. coccodes* (Salman *et al.*, 2014 y 2015).

## CONCLUSIONES

Se demostró que aislamientos de *Colletotrichum* pertenecientes a las especies filogenéticas *C. fructicola*, *C. asianum* y *C. dianesei* del clado gloeosporioides, obtenidas de mango, tienen la capacidad de formar entre ellas recombinantes sexuales y heterocariones, como se demostró mediante pruebas de compatibilidad sexual y/o vegetativa (mediante pruebas de compatibilidad micelial y uso de mutantes *nit*). Lo anterior demuestra que estas especies filogenéticas no se encuentran aisladas reproductivamente. En la medida que se identifiquen nuevos aislamientos de especies de este clado compatibles sexualmente, podrán ser utilizados en determinar su capacidad de desarrollar poblaciones recombinantes y establecer su aporte en la formación de nuevas especies filogenéticas. De igual manera, la identificación de cepas probadoras vegetativamente compatibles permitirá establecer grupos de compatibilidad dentro del clado.

## RECOMENDACIONES

En esta investigación se evaluó la capacidad de compatibilidad sexual y vegetativa entre aislamientos de cuatro especies filogenéticas del clado gloeosporioides obtenidas de mango, por lo que es conveniente realizar pruebas de este tipo entre especies filogenéticas de este clado identificadas de otros hospederos. Este tipo de estudio puede extenderse a analizar especies filogenéticas dentro del clado gloeosporioides y en otros clados, con el fin de contar con cepas probadoras sexual y vegetativamente compatibles que permitan establecer su capacidad en el desarrollo de nuevas especies filogenéticas en el género *Colletotrichum*.

## LITERATURA CITADA

- Abang, M. M., Hoffman, P., Winter, S., Green, K. R. and Wolf, G. A. 2004. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. *Phytopathology* 152:21–27.
- Akinsanmi, O. A., Backhouse, D., Simpfendorfer, S. and Chakraborty, S. 2008. Mycelial compatibility reactions of australian *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* isolates compared with AFLP groupings. *Plant Pathology* 27:251–261.
- Arx, J. A. von and Müller, E. 1954. Die amerosperen gattungen der Pyrenomyceten. *Beitrage zur Kryptogamenflora der Schweiz* 11:1–434.
- Arx, J. A. von. 1957. Die arten der gattung *Colletotrichum* Corda. *Phytopathologische Zeitschrift* 29:413–468.
- Bailey, J. A., O’Connell, R. J., Pring, R. J. and Nash, C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J. A. and Jeger, M. J. (eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, CAB International. pp. 88–120.
- Barari, H., Dalili, S. A. and Badalian, S. M. 2014. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* on different hosts in north of Iran. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 10:45–57.
- Barcelos, Q. L., Souza, E. A., and Damasceno e Silva, K. J. 2011. Vegetative compatibility and genetic analysis of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Brazil. *Genetics and Molecular Research* 10(1):230–242.
- Barcelos, Q. L., Pinto, J. M. A., Vaillancourt, L. J. and Souza, E. A. 2014. Characterization of *Glomerella* strains recovered from anthracnose lesions on common bean plants in Brazil. *PLoS ONE* 9(3): e90910. doi:10.1371/journal.pone.0090910.
- Batista, U. G. and Chaves, G. M. 1982. Patogenicidade de culturas monoascospóricas de cruzamento entre racas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.)Scrib. *Fitopatologia Brasileira* 7:285–293.
- Bayman, P. and Cotty, P. J. 1991. Vegetative compatibility and genetic diversity in the *Aspergillus flavus* population of a single field. *Canadian Journal of Botany* 69:1707–1711.
- Beever, R. E., Olsen, T. L. and Parkes, S. L. 1995. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*) from apple and other fruits. *Australasian Plant Pathology* 24:126–132.
- Beever R. E. and Parkes S. L. 2003. Use of nitrate nonutilising (Nit) mutants to determine vegetative compatibility in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *European Journal of Plant Pathology* 109:607–613.
- Behnia, M., Javan-Nikkhah, M., Aminian, H., Razavi, M. and Alizadeh, A. 2016. Population structure and sexual fertility of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato from citrus in northern Iran. *Journal of Agrrcultural Science and Technology* 18:561–573.

- Ben-Daniel, B., Bar-Zvi, D., Johnson, D., Harding, R., Hazanovsky, M., Tsrur (Lahkim), L. 2010. Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes* subpopulations from Australia and genetic links with subpopulations from Europe/Israel and North America. *Phytopathology* 100:271–278.
- Benítez-Camilo, F. A., Huerta-Palacios, G., Holguín-Melédez, F. y Toledo-Arreola, J. 2003. Efecto de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en la caída de Frutos de Mango (*Manguifera indica* L.) cv. Ataulfo en el Soconusco, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(2):223–227.
- Bezerra, C. S., Correia, K. C., Câmara, M. P. S., Sales Jr., R., Armengol, J. and Michereff, S. J. 2013. Population structure of *Monosporascus cannonballus* isolated from melons produced in Northeastern Brazil based on mycelial compatibility groups. *Acta Scientiarum. Agronomy* 35:161–167.
- Bolkan, H. A. and Ribeiro, W. R. C. 1985. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* isolates from Brazil. *Plant Disease* 69:599–601.
- Brooker, N. L., Leslie, J. F. and Dickman, M. B. 1991. Nitrate nonutilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. *Phytopathology* 81:672–677.
- Cai, L., Hyde, K. D., Taylor, P. W. J., Weir, B., 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: Prusky, D., Freeman, S. and Dickman, M. B. (eds.) *Colletotrichum. Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*, APS Press. 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.
- Carvalho, C. R. and Mendes-Costa, M. C. 2011. Vegetative compatibility and heterokaryon formation between different isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using the *nit* mutant system. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:346–353.
- Castrillo, L. A., Griggs, M. H. and Vandenberg, J. D. 2004. Vegetative compatibility groups in indigenous and mass-released strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: likelihood of recombination in the field. *Journal of Invertebrate Pathology* 16:26–37.
- Chacko, R. J., Weidemann, G.J., Tebeest Cove, D. J. 1994. The use of vegetative compatibility and heterokaryosis to determine potential asexual gene exchange in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biological Control* 4: 382–389.
- Cisar, C. R., Spiegel, F. W., TeBeest, D. O. and Trout, C. 1994. Evidence for mating between isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* with different host specificities. *Current Genetics* 25:330–335.

- Correll, J. C., Klittich, C. J. R. and Leslie, J. F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640–1646.
- Cove, D. J. 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology and Biological Oxidation* 113:51–56.
- Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: Otte, D., Endler, J., eds. *Speciation and its consequences*. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates. p 28–59.
- 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. 2012. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73:1–36.
- Damm, U., Woudenberg, J. H. C., Cannon, P. F. and Crous, P. W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45–87.
- Darshana, C. N., Praveena, R., Ankegowda, S. and Biju, C. N. 2014. Morphological variability, mycelial compatibility and fungicidal sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* causing leaf spot of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Journal of Spices and Aromatic Crops* 23:211–223.
- Del Rivero, J. M. 1990. La enfermedad de la caída de la fruta en cítricos. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 16(1):723–731.
- Du, M., Schardl, C. L. and Vaillancourt, L. J. 2005. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97(3):641–658.
- ElSharawy, A. A., Yang, G., Xiaoping, H. and Yang J. 2015. Genetic relationships between virulence, vegetative compatibility and ISSR marker of *Verticillium dahliae* isolated from cotton. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 48:646–663.
- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M. and Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90:608–614.
- Glass, N. L. and Kuldau, G. A. 1992. Matyng type and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology* 30:201–224.
- Guerber, J. C. and Correll J. C. 2001. Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia*, 93:216–229.
- Guerber, J. C., Liu, B., Correll, J. C., Johnston, P. R. 2003. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95:872–895.
- Gupta, V. K., Pandey, A., Kumar, P., Pandey, B. K., Gaur, R. K., Bajpai, V., Sharma, N. and Sharma, S. 2010. Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. by random amplified polymorphic DNA analysis. *African Journal of Biotechnology* 9:4009–4013.

- Gutiérrez-Alonso, J. G., Nieto-Ángel, D., Téliz-Ortiz, D., Zavaleta-Mejia, 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.
- Harrington, T. C. and Rizzo, D. M. 1999. Defining species in the fungi. In: Worrall J. J. (ed.) *Structure and Dynamics of Fungal Populations*, Kluwer Press. Dordrecht, The Netherlands. pp. 43–71.
- Heilmann, L. J., Nitzan, N., Johnson, D. A., Pasche, J. S., Doetkott, C. and Gudmestad, N. C. 2006. Genetic variability in the potato pathogen *Colletotrichum coccodes* as determined by amplified fragment length polymorphism and vegetative compatibility group analyses. *Phytopathology* 96:1097–1107.
- 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.
- Huang, F., Chen, G. Q., Hou, X., Fu, Y. S., Cai, L., Hyde, K. D. and Li, H. Y. 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity* 61:61–74.
- 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., 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.
- Irani, H., Heydari, A., Javan-Nikkhah, M. and Şavəli, I.A. 2011. Pathogenicity variation and mycelial compatibility groups in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Plant Protection Research* 51:329–336.
- Kimati, H. and Galli, F. 1970. *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*, fase ascogena do agente causal da anthracnose do feijoeiro. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"* 27:411–437.
- Kimura, A., Takano, Y., Furusawa, I. and Okuno, T. 2001. Peroxisomal Metabolic Function Is Required for Appressorium-Mediated Plant Infection by *Colletotrichum lagenarium*. *The Plant Cell* 13: 1945–1957.
- Krnjaja, V., Lević, J., Stanković, S. and Vasić, T. 2013. The use of vegetative compatibility tests for identification of biodiversity of phytopathogenic fungi. *Pesticides and Phytomedicine* 28:157–165.
- Latunde-Dada, A. O. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 4:187–198.
- Lee, S. C., Ni, M., Li, W., Shertz, C. and Heitman, J. 2010. The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74:298–340.

- Leslie, F. J. 1993. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology* 31:127–150.
- Lima, N. B., Batista, M. V. A., Jr, M. A. M., 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.
- Manandhar, J. B., Hartman, G. L. and Sinclair, J. B. 1986. *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines*. *Phytopathology* 76:282–285.
- Masel, A. M., Irwin, J. A. G. and Manners, J. M. 1993. Mini-chromosomes of *Colletotrichum* spp. infecting several host species in various countries. *Mycological Research* 97:852–856.
- Mayden, R. L. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: Claridge M.F., Dawah H.A. and Wilson M.R. (eds.) *Species: The Units of Biodiversity*, Chapman & Hall. pp. 281–424.
- McCallum, B. D., Tekauz, A. and Gilbert, J. 2004. Barrage zone formation between vegetatively incompatible *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates. *Phytopathology* 94:432–437.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S. and Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters* 98:137–43.
- Menat, J., Armstrong-Cho, C. and Banniza, S. 2016. Lack of evidence for sexual reproduction in field populations of *Colletotrichum lentis*. *Fungal Ecology* 20:66–74.
- Merteley, J. C. and Legard, D. E. 2004. Detection, Isolation, and Pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. *Plant Disease* 88:407–412.
- Mohammadi, A., Nejad, R. F. and Mofrad, N. N. 2012. *Fusarium verticillioides* from sugarcane, vegetative compatibility groups and pathogenicity. *Plant Protection Science* 48:80–84.
- Moreno, B. y Acevedo, R. 2002. Caracterización patogénica y estudio de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk. *Revista Iberoamericana de Micología* 19:115–119.
- Motallebi, P., Javan-Nikkhah, M., Okhovvat, S. M., Fotouhifar K. B. and Bargnil, M. 2009. Vegetative compatibility groups within iranian populations of *Magnaporthe grisea* species complex from rice and some grasses. *Journal of Plant Pathology* 91:469–473.
- Phoulivong, S. 2011. *Colletotrichum*, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. *Current Research in Environmental and Applied Mycology* 1:53–73.
- Pinto, J. M. A., Pereira, R., Mota, S. F., Ishikawa, F. H. and Souza, E. A. 2012. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* Populations. *Phytopathology* 102(5):490–497.
- Pontecorvo, G. 1956. The parasexual cycle in fungi. *Annual Reviews in Microbiology* 10:393–400.



- Pontecorvo, G. 1963. The Leeuwenhoek Lecture: Microbial genetics: retrospect and prospect. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 158:1–23.
- Remesal, E., Jordán-Ramírez, R., Jimenez-Díaz, R. M. and Navas-Cortés, J. A. 2012. Mycelial compatibility groups and pathogenic diversity in *Sclerotium rolfsii* populations from sugar beet crops in mediterranean-type climate regions. *Plant Pathology* 61:739–753.
- Roca, M. M. G., Machado, J. D. C., Vieira, M. G. C, Davide, L. C. and Rocha, M. L. 2004. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. *Fitopatol Brasa* 29:016–020.
- Rohana, W. H. T., Aggarwal, R. and Agarwal, D. K. 2005. Morphological and molecular characterization of five *Colletotrichum* species from India. *Indian Phytopathology* 58:448–453.
- Rodríguez G. R. 2002. Mecanismos que generan variabilidad genética en el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal de la antracnosis del frijol. Tesis doctoral. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. 92 p.
- Rodríguez-Guerra, R., Ramírez-Rueda, M. T., Cabal-Enciso, M., García-Serrano, M., Lira-Maldonado, Z., Guevara-González, R. G., González-Chavira, M. and Simpson, J. 2005. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. *Mycologia* 97(4):798–808.
- Rodríguez-Guerra, R., Ramírez-R., M. T., Martínez de la Vega, O. and Simpson, J. 2003. Variation in genotype, pathotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Mexico. *Plant Pathology* 52:228–235.
- Rodríguez-Guerra, R., Ramírez-Rueda, M. T. y Simpson, J. 2004. Capacidad de anastomosis de cepas del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib., agente causal de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:37–43.
- Roe, A. D., Rice, A. V., Bromilow, S. E., Cooke, J. K., Sperling, F. A. H. 2010. Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: insights from blue stain fungal symbionts of the mountain pine beetle. *Molecular Ecology Resources* 10:946–959.
- Salman, A., Shufan, E., Lapidot, I., Tsrer, L., Moreh, R., Mordechaid, S. and Huleihel, M. 2015. Assignment of *Colletotrichum coccodes* isolates into vegetative compatibility groups using infrared spectroscopy: a step towards practical application. *The Royal Society of Chemistry* 11:39–54.
- Salman, A., Shufan, E., Tsrer, L., Moreh, R., Mordechai, S. and Huleihel, M. 2014. Classification of *Colletotrichum coccodes* isolates into vegetative compatibility groups using infrared attenuated total reflectance spectroscopy and multivariate analysis. *Methods* 68:325–330.
- Sant'Anna, J. R., Miyamoto, C. T., Rosada, L. J., Franco, C. C. S., Kaneshima, E. N. and Castro-Prado, M. A. A. 2010. Genetic relatedness of brazilian *Colletotrichum*

- truncatum* isolates assessed by vegetative compatibility groups and RAPD analysis. *Biological Research* 43:51–62.
- Saupe, S. J. 2000. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:489–502.
- Schfer, M. R. and Kohn, L. M. 2006. An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia* 98:593–597.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndor, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109(16):6241–6246.
- Shcolnick, S., Dinoor, A. and Tsrer, L. 2007. Additional vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes* subpopulations from Europe and Israel. *Plant Disease* 91:805–808.
- Silva, D. N., Talhinas, P., Várzea, V., Cai, L., Paulo, O. S. and Batista, D. 2012. Application of the *Apn2*/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycology* 104:396–409.
- Sreenivasaprasad, S., Sharada K., Brown, A. E. and Mills, P. R. 1996. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45:650–655.
- Sousa, E. A., Camargo Jr, O. A. and Pinto, J. M. A. 2010. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. *Genetics and Molecular Research* 9(3):1759–1769.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA, Jeger MJ, eds. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingford, UK: CAB International. p 1–26.
- Taylor, J. W. and Fisher, M. C. 2003. Fungal multilocus sequence typing – it’s not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 6:351–356.
- Thaug, M. M. 2008. Coelomycete systematics with special reference to *Colletotrichum*. *Mycoscience* 49:345–350.
- Tinline, R. D. and MacNeil, B. H. 1969. Parasexuality in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 7:147–170.
- 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, Campus Montecillo, Estado de México. 116 p.
- Tuncer, S. and Eken C. 2013. Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* spp. isolated from pepper in Erzincan, Turkey. *Plant Protection Science* 49:127–131.
- Vaillancourt, L. J. and Hanau, R. M. 1991. A method for genetic analysis of *Glomerella graminicola* (*Colletotrichum graminicola*) from maize. *Phytopathology* 81:530–534.

- Vaillancourt, L. J. and Hanau, R. M. 1992. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella* (*Colletotrichum*) isolates from maize and from sorghum. *Experimental Mycology* 16:219–229.
- Vaillancourt, L. J. and Hanau R. M. 1999. Sexuality of self-sterile strains of *Glomerella graminicola*. *Mycologia* 91:593–596.
- Várzea, V. M. P., Rodrigues Jr., C. J. and Lewis, B.G. 2002. Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawae* in comparison with other related species from coffee. *Plant Pathology* 51:202–207.
- 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.
- Xiao, C. L., Mackenzie, S. J. and Legard, D. E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. *Phytopathology* 94:446–453.
- Zainudin, N. A. I. M., Sidique, S. N. M. and Salleh, B. 2008. Genetic diversity of *Fusarium fujikuroi* isolated from bakanae disease of rice on the basis of vegetative compatibility. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 31:271–278.