



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**BIOCONTROL DE *Colletotrichum spp.* EN
LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*,
SWINGLE) EN EL ESTADO DE GUERRERO**

SANDRA VIANEY GONZÁLEZ ZAVALETA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

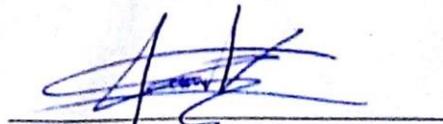
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2017

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe SANDRA VIANEY GONZÁLEZ ZAVALA, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "BIOCONTROL DE Colletotrichum spp. EN LIMÓN MEXICANO (Citrus aurantifolia, SWINGLE) EN EL ESTADO DE GUERRERO" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 19 de OCTUBRE de 2017


Firma del
Alumno (a)


DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: BIOCONTROL DE *Colletotrichum* spp. EN LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*, SWINGLE) EN EL ESTADO DE GUERRERO realizada por la alumna: SANDRA VIANEY GONZÁLEZ ZAVALA bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

FIRMA

DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESOR

DR. DANIEL NIETO ÁNGEL

ASESOR

M.C. MOISÉS GRACIANO CARCAÑO MONTIEL

ASESORA

DRA. OLGA GÓMEZ RODRÍGUEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2017

BIOCONTROL DE ANTRACNOSIS EN LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*, SWINGLE) EN EL ESTADO DE GUERRERO

Sandra Vianey González Zavaleta, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El ataque de *Colletotrichum* spp. en periodos de lluvias frecuentes propicia que la enfermedad de la antracnosis cause pérdidas económicas significativas. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo buscar antagonistas nativos para el control de la antracnosis en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*, Swingle). Para ello se colectaron muestras al azar en árboles de limón mexicano con síntomas de antracnosis en la huerta localizada en el ejido “El Tomatal”, municipio de Iguala de la independencia, Guerrero. Para la identificación molecular del patógeno se utilizaron los iniciadores ITS5 e ITS4. Las secuencias se compararon con las depositadas en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Se identificaron dos especies de *Colletotrichum* spp., con un grado de identidad del 100% correspondiente a *Colletotrichum gloeosporioides* y 99% a *C. lupini* o *C. acutatum*, lo cual se corroboró mediante el análisis filogenético. Los ensayos de patogenicidad realizados en hojas y frutos de diferentes edades, mostraron mayor susceptibilidad en muestras jóvenes. Las bacterias nativas mostraron baja actividad antagonica sobre el patógeno, contrario a los hongos antagonistas que mostraron mayor inhibición.

Palabras clave: Antracnosis, identificación molecular, patogenicidad, antagonismo.

**BIOCONTROL OF ANTHRACNOSE IN MEXICAN LEMON (*Citrus aurantifolia*,
[Christm.] Swingle) IN THE STATE OF GUERRERO**

Sandra Vianey González Zavaleta, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The attack of *Colletotrichum* spp. in periods of frequent rain favors the anthracnose disease causes significant economic losses. Therefore, this research aims to find native bacterial strains to control anthracnose in Mexican lime (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle). Random samples were collected in Mexican lime trees with symptoms of anthracnose in the orchard located in the ejido "The Tomatal", municipality of Iguala, Guerrero. The ITS4 and ITS5 primers were used for the pathogen molecular identification. The sequences were compared with those deposited in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Two *Colletotrichum* species were identified, with a degree of identity of 100% corresponding to *Colletotrichum gloeosporioides* and 99% corresponding to *C. acutatum* or *C. lupini*, which was corroborated by phylogenetic analysis. Pathogenicity tests performed on leaves and fruits of different ages showed increased susceptibility in young samples. Native bacteria showed low antagonistic activity on the pathogen, in contrast antagonists fungi exhibited the highest inhibition.

Keywords: Anthracnose, molecular identification, pathogenicity, antagonism.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Ricardo González Mateos y Sandra Zavaleta Pineda por el apoyo incondicional y el entusiasmo que me han brindado en todo este camino que no ha sido fácil, lleno de aprendizajes y experiencias que guardaré para siempre.

Agradezco a Julio Arístides Flores Morales por recorrer conmigo toda esta experiencia, por comprenderme, apoyarme y ayudarme en los momentos cuando más necesitaba.

También quiero agradecer a mis amigos que además de asesorarme me brindaron su amistad y cariño, especialmente Edith Maldonado Cruz y Jorge Zambrano Gutiérrez quienes me explicaron y me dieron apoyo en los momentos más difíciles sin pedir nada a cambio, les estaré agradecida y les recordaré toda la vida.

A todo mi consejo por el respaldo que me han dado brindado: Dr. David Espinosa Victoria, Dra. Olga Gómez Rodríguez, Dr. Daniel Nieto Ángel y M.C. Moisés Graciano Carcaño Montiel.

Asimismo agradezco a la M.C. Victoria Ayala Escobar, Dra. Hilda Silva Rojas, Dr. Sergio Aranda Ocampo, Dr. Daniel Téliz Ortiz, Dra. Leticia Robles Yerena, al Sr. Carlos (Laboratorio de bacterias fitopatógenas), Ma. Del Carmen Bojorges, Dr. Javier Suárez Espinosa y la Dra. Libia Iris Trejo Téllez por su apoyo y asesoría.

Al COCYTIEG por apoyarme y motivarme a mis estudios de postgrado.

Agradezco a CONACYT por apoyarme económicamente y al COLPOS Montecillo por hacer que esta investigación se hiciera realidad.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mis queridos padres Sandra y Ricardo, gracias por apoyarme y confiar siempre en mí, sin ustedes nada de esto se habría hecho realidad. Gracias por demostrarme su amor y estar siempre a mi lado en mis éxitos y fracasos. Los amo.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE CUADROS	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivo general	3
Objetivos específicos.....	3
Hipótesis.....	4
Referencias	4
CAPÍTULO I. PATOSISTEMA <i>Citrus aurantifolia</i>- <i>Colletotrichum</i> spp: UNA REVISIÓN	7
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1.1 Género <i>Citrus</i>	9
1.1.1 Limón mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i> [christm.] Swingle)	11
1.2 El género <i>Colletotrichum</i>	13
1.2.1 Clasificación taxonómica	13
1.2.2 Importancia.....	13
1.2.3 Rango de hospedantes	14
1.2.4 Síntomas	15
1.2.5 Aspectos biológicos de la interacción.....	16
1.2.6 Evidencias de comunicación entre los organismos de la interacción	20
1.2.7 Alteraciones fisiológicas en los participantes de la interacción	23
1.2.8 Biología y genética molecular.....	24
1.2.9 Control.....	27
1.3. Referencias Citadas	29
CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>Colletotrichum</i> spp. AISLADO DE LIMÓN MEXICANO Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	34
RESUMEN	34

ABSTRACT	35
2.1 Introducción	36
2.2 Materiales y Métodos	37
2.2.1 Material vegetal y aislamiento fúngico de <i>Colletotrichum</i> spp.	37
2.2.2 identificación morfométrica	38
2.3 Identificación molecular	39
2.3.3.1 Extracción de ADN y PCR	39
2.3.3.2 Análisis de secuencias	39
2.3.3.3 Pruebas de patogenicidad	40
2.2.4 Análisis estadístico	40
2.4 Resultados y discusiones	41
2.4.1 Aislados fúngicos.	41
2.4.2 Identificación morfométrica.....	41
2.4.3 PCR y secuenciación del ADN.	44
2.4.4 Ensayos de patogenicidad y Síntomas de antracnosis en limón mexicano.	46
2.5 Conclusiones	51
2.6 Referencias citadas	52
CAPÍTULO III. MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS NATIVOS CONTRA <i>Colletotrichum</i> spp AISLADOS DE LIMÓN MEXICANO	54
RESUMEN	54
ABSTRACT	55
3.1 introducción	56
3.2 Mecanismos de biocontrol.....	58
3.2 Materiales y métodos	61
3.2.1 Obtención de aislados	61
3.2.2 Pruebas de antagonismo en placa	62
3.2.3 Identificación molecular	62
3.2.3.1 Extracción de ADN y PCR	62
3.2.3.2 Análisis de secuencias	63
3.2.3.3 Análisis estadístico.	63

3.3 Resultados y discusiones	64
3.3.1 Aislamiento de antagonistas y ensayos antagónicos.	64
3.3.2 Identificación molecular.	70
3.3.3 Capacidad antagónica contra <i>Colletotrichum</i> spp.	70
3.4 Conclusiones	71
3.5 Referencias citadas	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de limas y limones en 2014 (FAO, 2017).....	10
Figura 2. Principales Estados productores de limón mexicano en 2015 (SIAP, 2015).	12
Figura 3. Ciclo de vida e infección de <i>Colletotrichum acutatum</i> , agente causal de antracnosis en limón mexicano (Orozco-Santos y Timmer, 2005).	18
Figura 4. Estrategias de infección adoptadas por especies de <i>Colletotrichum</i> . A, Infección intracelular hemibiotrofica. B, Infección necrótrofica intramural subcuticular . Conidio (C); apresorio (A); cutícula del huésped (Cu); punto de luz interna (ILS); hifas primarias (PH); células epidérmicas (E); células del mesófilo (M); hifa secundaria (SH); subcuticular (Sch) (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).	19
Figura 5. Medición de conidios de <i>Colletotrichum</i> spp.	38
Figura 6. A. Frutos asintomáticos de limón de tres edades diferente; B. Hojas asintomáticas de limón de tres edades diferente.	40
Figura 7. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> spp. en medio de cultivo PDA. Eje X corresponde al tiempo (en días) del crecimiento de <i>Colletotrichum</i> spp. Eje Y corresponde al área de crecimiento (mm).	42
Figura 8. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> spp. en medio de cultivo V8. Eje X corresponde al tiempo (en días) del crecimiento de <i>Colletotrichum</i> spp. Eje Y corresponde al área de crecimiento (mm).	43
Figura 9. Separación de aislamientos mediante el análisis morfométrico de los conidios de <i>Colletotrichum</i> spp. Eje X corresponde a los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. Eje Y corresponde al área de los conidios (μm).	44
Figura 10. Fragmentos de PCR en gel agarosa (1.5%) obtenidos por la amplificación del ADN de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> provenientes de tejido de limón mexicano y control negativo (C-) utilizando los primers ITS5/ITS4.	45
Figura 11. Árbol Neighbour-joining método Kimura- 2 de 24 secuencias ITS de los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	46

Figura 12. Síntomas de la enfermedad de antracnosis en limón mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i> , Swingle) en campo y resultados de las pruebas de patogenicidad. Tizón en ramas y muerte progresiva (A), fruto con presencia de lesión necrótica (B), hojas con lesiones necróticas y halos cloróticos (C), Racimo florar afectado mostrando necrosis en pétalos (D), Hojas afectadas por inoculación del patógeno (E, F) y frutos inmaduros afectados por inoculación del patógeno (G, H).	47
Figura 13. Síntomas en hojas en la prueba de patogenicidad de <i>Colletotrichum</i> spp. y aislamientos con mayor grado de virulencia en hojas de limón mexicano.	48
Figura 14. Síntomas en fruto en la prueba de patogenicidad de <i>Colletotrichum</i> spp. (A). Frutos pequeños, (B). Fruto mediano, (C) Fruto grande.	48
Figura 15. Ensayos de antagonismo con bacterias nativas contra <i>Colletotrichum</i> sp. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. solo (A, D, G). Crecimiento de Bacteria sola (B, E, H), Cultivo dual, crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. con una bacteria nativa (C, F, I).....	65
Figura 16. Prueba de antagonismo del aislamiento N1 contra el aislamiento de <i>Colletotrichum</i> sp. (A1). A. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. con antagonista N1. C. Crecimiento de antagonista solo.	67
Figura 17. Prueba de antagonismo del aislamiento N3 contra el aislamiento de <i>Colletotrichum</i> sp. (A1). A. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. con antagonista N3. C. Crecimiento de antagonista solo.	68
Figura 18. Prueba de antagonismo del aislamiento N5 contra el aislamiento de <i>Colletotrichum</i> sp. (A1). A. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. con antagonista N5. C. Crecimiento de antagonista solo.	68
Figura 19. Prueba de antagonismo del aislamiento N6 contra el aislamiento de <i>Colletotrichum</i> sp. (A1). A. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. solo. B.	

Cultivo dual, crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. con antagonista N6. C.	
Crecimiento de antagonista solo.....	69
Figura 20. Prueba de antagonismo del aislamiento N7 contra el aislamiento de <i>Colletotrichum</i> sp. (A1). A. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. con antagonista N7. C. Crecimiento de antagonista solo.....	69
Figura 21. Prueba de antagonismo del aislamiento N13 contra el aislamiento de <i>Colletotrichum</i> sp. (A1). A. Crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de <i>Colletotrichum</i> sp. con antagonista N13. C. Crecimiento de antagonista solo.....	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales productores de limas y limones a nivel mundial (FAO, 2017).	10
Cuadro 2. Genes clonados usados en estudios para patrones de expresión en flores de cítricos por <i>C. acutatum</i> (Li <i>et al.</i> , 2003).....	26
Cuadro 3. Área de lesiones causadas por <i>Colletotrichum</i> spp. en fruto de limón mexicano.....	49
Cuadro 4. Comparaciones de la lesión de <i>Colletotrichum</i> spp. de acuerdo a la edad del fruto.	49
Cuadro 5. Comparación de virulencia entre aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. en frutos.	50
Cuadro 6. Comparaciones de la lesión de <i>Colletotrichum</i> spp. de acuerdo a la edad de la hoja.....	50
Cuadro 7. Comparación de virulencia entre aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. en hojas de limón mexicano.....	51
Cuadro 8. Agentes de control biológico y sus mecanismos de acción (Carcaño-Montiel <i>et al.</i> , 2006; Di Barbaro <i>et al.</i> , 2014; Freeman <i>et al.</i> , 2004; Santos-Villalobos <i>et al.</i> , 2012; Živković <i>et al.</i> , 2010).	58
Cuadro 9. Biofungicidas con componente activo de bacterias u hongos comercializados en diferentes países, incluyendo los específicos para cítricos (Fernández y Juncosa, 2002).	60
Cuadro 10. Comportamiento de hongos y actinomicetos en las pruebas de antagonismo contra <i>Colletotrichum</i> spp.	71

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los cítricos tienen origen en las regiones tropicales y subtropicales de Asia y el archipiélago malayo. Se considera que el limón se originó en el este del archipiélago Indio, y que se dispersó por todo el mundo, estableciéndose las primeras huertas en México en 1912. En el país se cultivan principalmente tres especies de cítricos: el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*, Swingle), el limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) y el limón verdadero o limón italiano (*Citrus limon* Burm), todos ellos considerados como limones por el carácter ácido de su jugo (Secretaría de Desarrollo Rural, 2005). A nivel mundial, México es el principal productor de limón mexicano. Las entidades productoras más importantes son Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Colima y Yucatán, que juntas producen más de 1, 799, 397.95 t, representando el 80% de la producción nacional (López, 2014; SIAP, 2014).

El cultivo de limón mexicano con espinas es uno de los cultivos estratégicos para el estado de Guerrero, debido a su excelente adaptación a los agroecosistemas, frutos de buena calidad, que promete grandes beneficios socioeconómicos para viveristas, productores, asesores técnicos, jornaleros, empaques, industriales y comerciantes (Noriega *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013). La producción anual de fruta es superior a 1, 041 millones de toneladas, que alcanza un valor estimado de 2, 535 millones de dólares (Robles-González *et al.*, 2013). La Secretaría del Desarrollo Rural (2014), informó que el estado de Guerrero ocupa el cuarto lugar en producción de limón mexicano a nivel nacional con más de 75 mil toneladas, y un total de 4 mil 156 productores registrados. Los principales municipios que cultivan limón mexicano son Acapulco, Cuajinicuilapa, San Marcos, Florencio Villareal y Coyuca de Benítez (Guerrero Gobierno del Estado, 2014), donde el 94% se consume en fresco y 6% se industrializa. El 70% de la producción se comercializa en tianguis y mercados locales y el otro 30% en mercados foráneos (Pereyda *et al.*, 2014).

La enfermedad denominada antracnosis en limón mexicano, es considerada la principal limitante en la producción de esta especie citrícola. Las lluvias frecuentes, el manejo inapropiado del huerto y la baja disponibilidad de recursos, propician una mayor incidencia de la enfermedad, lo cual genera pérdidas económicas importantes (Orozco-Santos *et al.*, 2006). Se ha reportado que *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, es el causante de la antracnosis (raza KLA) y la caída del fruto pequeño (CFP) en limón mexicano (Peres *et al.*, 2007). Asimismo, Knorr *et al.* (1957) evidenciaron la especificidad del ataque de la enfermedad sólo en limón mexicano y dominicano sin espinas, excluyendo a otras variedades.

En regiones tropicales y subtropicales, la enfermedad se agrava cuando coincide el periodo de lluvias con la producción de brotes vegetativos, flores y frutos en desarrollo (Ruiz *et al.*, 2014). *Colletotrichum* spp. induce marchitez y eventualmente ocasiona la muerte descendente en tejidos jóvenes, así como la caída de flores y frutos pequeños. En frutos desarrollados, se ha reportado que los síntomas ocasionados por *Colletotrichum* spp. afectan su comercialización. El porcentaje de frutos infectados, depende de la severidad de la enfermedad y de la edad de la planta. Se ha reportado que en árboles adultos la antracnosis reduce el crecimiento y afecta la calidad del fruto. Por el contrario, en árboles jóvenes retrasa su desarrollo (Orozco-Santos *et al.*, 2006).

El principal control que realizan los productores en ataques severos de la enfermedad, es el uso de agroquímicos, que ha generado contaminación ambiental. La excesiva e inadecuada aplicación, propicia la acumulación de compuestos tóxicos potencialmente peligrosos para los seres humanos y el ambiente, así como la resistencia a enfermedades y plagas que dificultan su control. Por lo anterior, el uso de microorganismos biocontroladores se vuelve una alternativa viable para el manejo de patógenos.

Los microorganismos antagonicos tienen gran importancia en el control biológico, debido a su acción interruptora sobre el desarrollo de patógenos. Los múltiples mecanismos de acción de los microorganismos antagonicos y su velocidad de crecimiento, evitan problemas de resistencia de los patógenos (Pal y McSpadden, 2006; Živković *et al.*, 2010). De acuerdo con Fernández-Larrea (2001), los principales microorganismos antagonicos utilizados como agentes de control biológico en diferentes cultivos son: *Gliocladium roseum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces noursei*, *Streptomyces natalensis*, *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride* y *T. longibrachiatum*, los cuales en pruebas *in vitro* muestran resultados exitosos y también algunos resultados favorables en su aplicación en campo (Tortora *et al.*, 2011; Živković *et al.*, 2010; Freeman *et al.*, 2004). Así, su uso podría ser promisorio para controlar la antracnosis en el cultivo de limón mexicano.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto *in vitro* de los microorganismos aislados en el ejido “El Tomatal”, municipio de Iguala, Guerrero en el control de *Colletotrichum spp.*, agente causal de la antracnosis en el cultivo de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*, Swingle).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar al agente causal de antracnosis en limón mexicano.
- Determinar la patogenicidad del agente causal de la antracnosis en limón mexicano.
- Aislar e identificar los agentes de biocontrol.
- Evaluar la respuesta antagonica *in vitro* de los agentes antagonistas en la inhibición del crecimiento del patógeno.

HIPÓTESIS

Las bacterias y hongos nativos controlan el crecimiento del hongo *Colletotrichum spp.*, responsable de la antracnosis en cultivo de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*, Swingle).

REFERENCIAS

Fernández-Larrea, O. (2001). Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica, 62, 96-100.

Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu, A., Dag, A., Shafir, S. & Elad, Y. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. Kluwer Academic Publishers. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 361–370.

Gobierno del Estado de Guerrero. 2014. Guerrero ocupa el cuarto lugar en producción de limón a nivel nacional. Consultado el 09 de Octubre de 2014 en <http://guerrero.gob.mx/2013/09/guerrero-ocupa-el-cuarto-lugar-en-produccion-de-limon-a-nivel-nacional/>

Knorr LC, Suit RF, & Ducharme EP. (1957). Handbook of citrus diseases in Florida. *Univ. Fla. Agr. Exp. Sta. Bull.* 587:77-79.

Noriega-Cantú, D., González-Mateos, R., Garrido-Ramírez, E., Pereyda-Hernández, J., Dominguez-Márquez, V. y López-Estrada, M. 2012. Evaluación de dos sistemas de producción de limón mexicano (*Citrus*

aurantifolia, Swingle) en Guerrero, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15: 415 – 425.

López, J. (2014). México, principal productor de limón en el mundo, pero el precio del cítrico NO deja de subir. Consultado el 08 de Octubre de 2014 en <https://a7.com.mx/index.php?notaid=31016>

Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V., Robles-González, M., Orozco-Romero, J., Pérez-Zamora, O., Velázquez-Monreal, J., Timmer, L., & Guzmán-González, S. (2006). Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. *INIFAP, Folleto Técnico*, (2): 1-16.

Pal, K. & MacSpadden, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 10, 1-25.

Pereyda-Hernández, J., Noriega-Cantú, D., González-Mateos, R., Dominguez-Marquez, V., y López-Estrada, M. 2014. Manual de producción orgánica de limón mexicano. Reporte Técnico de la Fundación Produce. Inédito.

Peres, S., MacKenzie, T., Peever, L. & Timmer, W. (2007). Postbloom Fruit Drop of Citrus and Key Lime Anthracnose Are Caused by Distinct Phylogenetic Lineages of *Colletotrichum acutatum*. *The American Phytopathological Society*, 98 (3), 345-352.

Robles-González, M., Velazquez-Monreal, J., Manzaniilla-Ramirez, M., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V., López-Arrollo, I. y Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del Hualglolgbing (HLB) en árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*, Christm Swingle) y su dispersión en el Estado de Colima, México. *Revista Chapingo serie Horticultura*. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo: México Vol. 19, No. 1, enero-abril 15-31.

- Ruíz, A., Parra, CC., da Graca JV., Salas, B., Malik, NSA & Kunta, M. (2014). Caracterización molecular y de ensayos de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la antracnosis del limón en Texas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, 52-61.
- Secretaría de Desarrollo Rural, 2005. Paquetes tecnológicos para el cultivo de Limón en el Estado de Colima. Diciembre (4): 3-29.
- SIAP. (2013). Producción agrícola del limón a nivel nacional. Consultado el 05 de Agosto de 2016 en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Tortora, M., Díaz-Ricci, J. & Pedraza, R. (2011). *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology*, 193(4), 275-286.
- Fernández-Larrea, O. (2001). Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica, 62, 96-100.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T. & Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 62 (3), 611-623.

CAPÍTULO I. PATOSISTEMA *Citrus aurantifolia*- *Colletotrichum* spp: UNA REVISIÓN

GONZÁLEZ-ZVALETA, Sandra¹, ESPINOSA-VICTORIA, David¹, NIETO-ÁNGEL, Daniel¹, GÓMEZ-RODRÍGUEZ, Olga¹, CARCAÑO-MONTIEL, Moisés².

¹ Programa de Edafología y Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, y ² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

RESUMEN

A nivel mundial, la citricultura es una de las actividades agronómicas más importantes debido al ingreso económico generado por la comercialización de frutos y subproductos. Sin embargo, existen diversos factores que pueden afectar su comercialización, una de ellas es *Colletotrichum* spp., un hongo fitopatógeno que infecta pétalos de flores de cítricos, causando lesiones marrones, caída de frutos jóvenes, producción de cálices persistentes y distorsión de las hojas. La interacción molecular en el proceso de infección, sugiere que ciertas hormonas pueden estar involucradas en el desarrollo de los síntomas. Desde su descripción, se ha puesto en controversia su taxonomía, principalmente por la falta de características morfológicas confiables. Mediante técnicas moleculares, se identificaron dos patotipos de *C. acutatum*: Antracnosis del Limón mexicano (KLA) y caída prematura de los frutos (CPF). Asimismo, estudios realizados a través de métodos de cDNA identificaron las hormonas involucradas en el proceso de infección de *Colletotrichum* spp. Dichos estudios concluyeron que la infección en flores cítricas desencadenan la expresión diferencial de genes, asociado principalmente con IAA, etileno, la producción y regulación de JA, y el aumento de la concentración de hormonas.

Palabras clave. Citricultura, *Colletotrichum* spp., interacción molecular, fitohormonas.

CHAPTER I.

***Citrus aurantifolia*- *Colletotrichum* spp. PATHOSYSTEM: A REVIEW**

ABSTRACT

Globally, citriculture is one of the most important agronomic activities due to the economic income generated by the commercialization of the fruits and by-products. However, there are several factors that can affect its commercialization, one of them is *Colletotrichum* spp. which is a phytopathogenic fungus that infects petals of citrus flowers, causing brown lesions, young fruit drop, persistent calice production and leaf distortion. The molecular interaction in the infection process, suggests that hormones are involved in the development of their symptoms. Since its description, the taxonomy of *Colletotrichum* has been put in controversy, mainly by the lack of reliable morphological characteristics. Using molecular techniques, two pathogens of *C. acutatum*: Mexican lemon anthracnose (KLA) and premature fruit drop (CPF) were identified. Also, studies using cDNA methods identified the hormones involved in the infection process of *Colletotrichum* spp. These studies concluded that infection in citrus flowers triggered differential gene expression, mainly associated with IAA, ethylene, production and regulation of JA, and increased concentrations of hormones.

Keywords. Citriculture, *Colletotrichum* spp., Molecular interaction, phytohormones.

1.1 GÉNERO *Citrus*

El género *Citrus* tiene su origen en los trópicos y subtropicos del este de Asia y del archipiélago indomalayo, región donde se encuentran diversas especies silvestres (León, 1968). De acuerdo con investigaciones sobre su génesis, sugieren que las clases existentes que darían origen a especies e híbridos en el mundo provienen principalmente de tres taxones: los cidros, los mandarinos y los pummelos o zamboas. La especulación sobre las especies primigenias ha concluido su procedencia del sureste asiático. Así, los cidros parecen ser originarios del sur de China y noreste de la India, los pummelos de la península de Malasia y la China meridional y los mandarininos del sureste de la China e Indochina (Chomé, 2011).

La distribución de los *Citrus* por el resto del mundo se extendió conforme avanzaban los descubrimientos y las conquistas. El primer *Citrus* conocido en Europa fue el cidro (*Citrus medica* L.), utilizado como repelente de polillas y no como fruto, el cual fue traído por soldados de Alejandro, expandiéndose en el Siglo I después de Cristo. La lima (*C. aurantifolia* Swingle) llegó a Europa en el Siglo III, aclimatándose en países del Mediterráneo. Su nombre se deriva de la palabra *limum*, introducida por los árabes y originaria del este de la India (León, 1968).

Se le considera a *Citrus aurantifolia* la primera especie en evolucionar al subgénero *Eucitrus*, debido a que éste es el resultado del entrecruzamiento de *Citrus medica*, *C. maxima* y *Microcitrus*. Tanto *C. reticulata*, *C. máxima* y *Microcitrus*, son las únicas especies verdaderas consideradas comestibles de *Citrus*, exceptuando al resto de los cítricos como híbridos interespecíficos (Scora, 1988).

Dentro de las especies de *Citrus* con mayor importancia comercial se encuentran: la naranja (*Citrus sinensis*), la mandarina (*Citrus reticulata*), la toronja (*Citrus paradisi*), y la lima y el limón (*Citrus aurantifolia*). De acuerdo con los datos obtenidos por la FAO en el 2014 (Figura 1), la producción de limas y limones en el

2014 fue de 220, 507.9 Ton, con un área cosechada de 156, 429 ha y un rendimiento de 14, 096.4 Kg/ha.

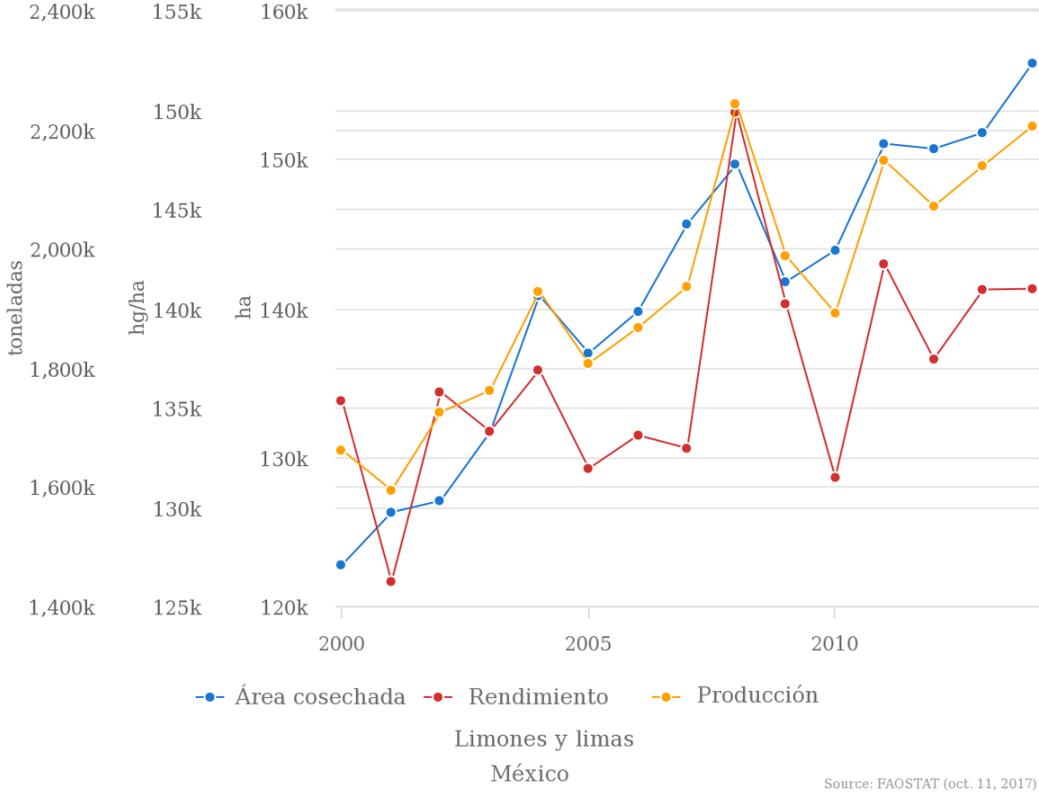


Figura 1. Producción de limas y limones en 2014 (FAO, 2017).

Asimismo, a nivel mundial, los principales productores de lima y limones en el 2013/2014 de acuerdo con estadísticas obtenidas de la FAO (Cuadro 1), México es el principal productor a nivel mundial, seguido de India y Brasil.

Cuadro 1. Principales productores de limas y limones a nivel mundial (FAO, 2017).

PRODUCCIÓN MUNDIAL DE LIMAS Y LIMONES 2013/2014

PAIS	PRODUCCIÓN [MTon]
México	2250
India	2200
Brasil	1100
España	1057
Turquía	725

1.1.1 Limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [christm.] Swingle)

El limón mexicano es una lima perteneciente a la familia de las Rutáceas, es un fruto ácido, pequeño, que representa a la especie *aurantifolia*, del género *Citrus*, originaria del sureste de Asia, especialmente del oriente de la India, la cual fue introducida por los españoles a las islas del Caribe y México. Las primeras plantaciones de limón establecidas en México se dieron en el Estado de Michoacán en 1912, con plantíos de árboles silvestres y posteriormente se extendieron a lo largo del país. Se conoce también al limón como Mexican lime, west indian lime, limón gallego, key lime, limón criollo, limón sutil, etc. (Secretaría de Desarrollo Rural, 2005).

Taxonómicamente el limón mexicano se ubica de la siguiente manera:

Familia: *Rutacea*

Sub- familia: *Aurantioideae*

Tribu: *Citreas*

Sub-tribu: *Citrinas*

Género: *Citrus*

Sub- género: *Eucitrus*

Especie: *aurantifolia*

Los árboles de limón son pequeños y ramificados, generalmente de 4 ó 5 m de altura y ramas con espinas. Su comportamiento fisiológico en la postcosecha de los frutos los clasifican como no climatéricos, por lo que la calidad organoléptica y nutricional del fruto sólo se alcanza durante su desarrollo en el árbol. Cuando el fruto es cosechado, su metabolismo experimenta el fenómeno de senescencia, en el cual se presenta la pérdida de clorofila (responsable del color verde), marchitamiento (debido a la elevada transpiración) y el endurecimiento de la piel, así como reacciones de fermentación (producción de etanol), pérdidas del valor nutricional (especialmente vitamina C) y aumento de susceptibilidad al ataque de patógenos (Saucedo, 2006).

México ocupa el primer lugar en la producción de limón a nivel mundial. Los principales estados productores de limón son: Michoacán (670, 612.69Ton), Veracruz (659, 034.15 Ton), Oaxaca (245, 137.29 Ton), Colima (191, 890.04 Ton) y Tamaulipas (121, 200.35 Ton). Sin embargo, para el cultivo de limón mexicano (agrio) los principales estados productores son: Michoacán (654, 895.69 Ton), Colima (185, 285.04), Oaxaca (75, 925.23 Ton) y Guerrero (71, 758.69 Ton) los cuales siembran más de 75 mil hectáreas plantadas (Figura 2) (SIAP, 2015).



Figura 2. Principales Estados productores de limón mexicano en 2015 (SIAP, 2015).

1.2 EL GÉNERO *Colletotrichum*

1.2.1 Clasificación taxonómica

El género *Colletotrichum* fue introducido en 1831 por Corda, sin embargo, desde su descripción se ha puesto en controversia su taxonomía, principalmente por la falta de características morfológicas confiables. El criterio principal para la delineación de especies, es su asociación con una planta-hospedante específica, a esto se debe la descripción de varios nombres de este género (Arzanlou *et al.*, 2015; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Las técnicas moleculares y las regiones genómicas de las secuencias, han contribuido a delinear los límites de las especies del género *Colletotrichum* así como de otros hongos (Arzanlou *et al.*, 2015).

Reino: Fungi.

Phylum: Ascomycota.

Clase: Sordariomycetes.

Familia: Glomerellaceae.

Género: *Glomerella*.

Especie: *C. gloesporioides*

1.2.2 Importancia

Colletotrichum es un hongo Ascomiceto asociado a la enfermedad denominada antracnosis, distribuido en zonas de clima tropical, subtropical y templado (Arzanlou *et al.*, 2015; Damm *et al.*, 2012; Yang *et al.* 2012; Orozco-Santos *et al.*, 2006; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Bajo condiciones de alta prevalencia de la enfermedad, el rendimiento de los árboles puede abatirse hasta en un 40% a 60% de la producción (Orozco-Santos *et al.*, 2004). Las especies de

este género comprenden una serie de patógenos devastadores de cultivos de importancia económica, por lo que se ha clasificado entre los diez principales fitopatógenos fúngicos por la comunidad Internacional de patología de plantas (Arzanlou *et al.*, 2015; Crouch *et al.*, 2014; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Esto es debido a pérdidas en postcosecha y a la capacidad de muchas especies de *Colletotrichum* por causar infecciones latentes o quiescentes, donde el hongo infecta la fruta inmadura en campo y hasta que ésta madura, manifiesta la enfermedad en la fruta, por lo que afecta a la calidad y cantidad de frutos cosechados (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

1.2.3 Rango de hospedantes

Colletotrichum se ha reportado como agente causal de la enfermedad conocida como antracnosis que afecta a diversas plantas hospedantes. El género incluye más de 100 especies patógenas responsables de causar tizón foliar y enfermedades de podredumbre de la mayoría de los cultivos que producen alimentos, fibras y forrajes en todo el mundo (Crouch *et al.*, 2014). Originalmente, el hongo fue reportado en Australia por Simmonds (1965) en *Carica papaya*, *Capsicum frutescens* y *Delphinium ajacis* presentando enfermedad en el tejido (Damm *et al.*, 2012). Asimismo, se ha observado su parasitismo, puesto que múltiples especies de *Colletotrichum* pueden parasitar a un hospedante y múltiples hospedantes pueden ser infectados por una sola especie de este patógeno (Phoulivong *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012).

De acuerdo con Robles (2015), los principales hospedantes de *Colletotrichum* spp. son los siguientes:

Solanáceas (tabaco, chile, papa), leguminosas (alfalfa, chícharo, soya, frijol, haba), gramíneas (sorgo, avena, caña de azúcar, maíz, pastos), orquídeas, malváceas (algodón, kenaf, okra, café) y diversas familias de frutales como Lauráceas (aguacate), Anacardiáceas (mango), Musáceas (plátano), Caricáceas (papaya),

Rutáceas (limón, naranja, lima), Rosáceas (fresa, durazno, almendro, manzana), Mirtáceas (guayaba), Anonáceas (guanábana, chirimoya), Rubiáceas (café) y Oleáceas (olivo).

1.2.4 Síntomas

La antracnosis se manifiesta en regiones tropicales y subtropicales, coincidiendo en los periodos de lluvia y la ocurrencia de brotes vegetativos, flores y desarrollo de frutos, mostrando una abundante esporulación debido a las masas conidiales del hongo con aspecto de polvillo color salmón. Este patógeno puede afectar a la mayoría de las partes de la planta, desde la raíz hasta las hojas, flores, ramas y frutos, causando enfermedades como la podredumbre de la corona de la raíz, la defoliación, muerte de las flores, y la pudrición de la fruta, donde es en esta última donde causa pérdidas más significativas al producir dos tipos distintos de enfermedad, en la fruta inmadura y desarrollo en el campo (pre-cosecha) y los daños en la fruta madura en la cosecha y durante el almacenamiento (después de la cosecha). Esto se debe a la capacidad de muchas especies de *Colletotrichum* de causar infecciones latentes o quiescentes en el que el hongo infecta la fruta inmadura en el campo y se convierte entonces en estado latente hasta que la fruta madura, en cuyo momento se reanuda su crecimiento causando la enfermedad en la fruta (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

Los brotes afectados presentan marchitez y eventualmente mueren a partir de las puntas sin embargo, su extensión depende de la severidad. En ataques severos puede ocasionar la muerte descendente en tejidos jóvenes, así como la caída de flores y frutos pequeños, sin embargo en frutos desarrollados produce lesiones que afectan su comercialización. La presencia de deformaciones y zonas muertas en el borde o el ápice se presenta en condiciones de daño medio, sin embargo en infecciones poco severas las hojas se afectan parcialmente o presentan lesiones cloróticas y deformación, también se pueden observar pequeñas lesiones

redondas que con el paso del tiempo se necrosan y pueden caer, originando un orificio conocido como “tiro de munición” (Orozco-Santos *et al.*, 2006).

Se ha observado que en árboles adultos la antracnosis reduce el crecimiento y afecta la calidad del fruto, por el contrario, en árboles jóvenes retrasa su desarrollo.

1.2.5 Aspectos biológicos de la interacción

Colletotrichum spp. pertenece al *Phylum* Ascomycota, es uno de los principales hongos patógenos responsable de importantes pérdidas económicas en frutales, causando la antracnosis y tizón en hospedantes de importancia agrícola tales como almendras (*Prunus dulcis* (Mill.)), aguacate (*Persea spp.*), durazno (*Prunus persica* L.), arándanos (*Vaccinium spp.*), cítricos (*Citrus spp.*), mango (*Mangifera indica* L.), olivo (*Olea europaea* L.), y fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en áreas tanto de climas templados como subtropicales y tropicales (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

El ciclo de vida comprende una etapa sexual y una asexual. En términos generales, la etapa asexual es responsable de la dispersión del hongo y la etapa sexual representa la variabilidad genética, sin embargo, ésta nunca se ha encontrado en el cultivo de los cítricos, ni se ha podido reproducir en medio de cultivo con aislamientos colectados en este grupo de frutales. Otro mecanismo por el que la diversidad genética se puede generar, es a través de compatibilidad vegetativa, es decir, la capacidad de las cepas de hongos individuales a someterse a anastomosis hifal mutua, lo que resulta en células fusionadas viables que contienen núcleos de ambas cepas parentales en un citoplasma común (Peres *et al.*, 2005; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

Las primeras etapas de desarrollo de hongos durante el proceso de infección son esencialmente las mismas para todas las especies de *Colletotrichum* y se pueden separar en fases (Figura 3) incluyendo: 1) deposición de los conidios sobre

las superficies de plantas, 2) la unión de conidios a las superficies, 3) germinación de los conidios, 4) Producción de apresorios, 5) penetración de la epidermis de la planta, 6) crecimiento y colonización de los tejidos vegetales, y 7) producción de acérvulos y esporulación. En *C. acutatum*, algunos conidios no siguen las etapas habituales del desarrollo ya que se someten a la formación de conidios microcíclicos en el que el conidio germina y produce un conidio secundario directamente desde el primero, sin producir un tubo germinativo o sin ser sometidos a crecimiento vegetativo. En otros, los conidios germinan y producen un tubo germinativo que crece a lo largo de la superficie de la planta hasta que entra en contacto con otras hifas o conidios de *C. acutatum*. Tras el contacto, los tubos germinales experimentan anastomosis hifal (Peres *et al.*, 2005; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

La aparición y relevancia de cada etapa en el proceso de infección puede variar dependiendo de las condiciones de crecimiento, el tejido del hospedante, la especie particular, el aislado fúngico así como los parámetros microclimáticos como la humedad y la temperatura los cuales son fundamentales para su desarrollo. Estudios han demostrado que la germinación y la diferenciación del tubo de germinación (es decir, la formación de apresorios o la formación de conidios microcíclicos), ocurren dentro de pocas horas (aproximadamente 3 a 48 h), por lo que las infecciones por este hongo pueden ocurrir rápidamente bajo condiciones favorables (Orozco-Santos *et al.*, 2006; Peres *et al.*, 2005; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

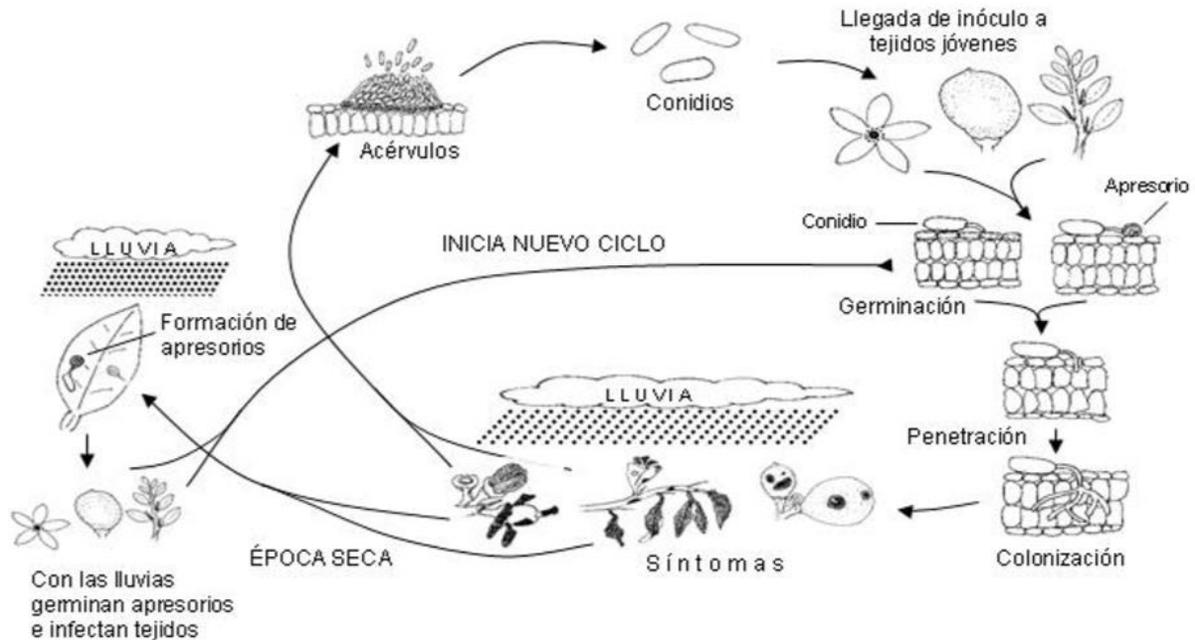


Figura 3. Ciclo de vida e infección de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de antracnosis en limón mexicano (Orozco-Santos y Timmer, 2005).

El proceso de penetración es una etapa crítica en cualquier interacción planta-patógeno. En *Colletotrichum*, la penetración de los tejidos del hospedante generalmente se basa en la formación de estructuras especializadas llamadas apresorios de infección, los cuales permiten que el hongo penetre la cutícula del hospedante y de la pared celular epidérmica directamente por medio de una clavija de penetración estrecha que emerge de la base del apresorio. Aunque es poco frecuente en *Colletotrichum*, hay informes de penetración indirecta de tejido a través de los estomas, o heridas sin la formación de apresorios (Peres *et al.*, 2005; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

Se conocen dos estrategias de infección de *Colletotrichum*: intracelular hemibiotrófica y necrotrofica intramural, subcuticular (Figura 4). En la primera estrategia se establece la infección por medio de una breve fase biotrófica la cual dura aproximadamente entre 24 h a 72 h, asociada con una gran hifa primaria intracelular la cual más tarde cambia a una fase necrotrofica destructiva, asociada

con hifas secundarias más estrechas, que se ramifican en todo el tejido del huésped tanto inter e intracelularmente. El segundo tipo de estrategia de infección empleado, necrotrofica intramural, subcuticular, se presenta después de la formación de apresorios y la penetración de la cutícula, en el cual el patógeno no penetra de inmediato la pared celular epidérmica subyacente ni entra en el lumen de células, sino que se desarrolla debajo de la cutícula, entre las paredes periclinales y anticlinales de las células epidérmicas. El desarrollo intramural se asocia con una gran hinchazón y la disolución de las paredes de la célula hospedante. Sin embargo, no está claro si las células hospedantes subyacentes permanecen vivas. No hay síntomas visibles, aparecen hasta 24 h después de la penetración, por lo que es posible que se produzcan una breve fase biotrófica o una fase necrotrofica benigna. Después del breve período asintomático, el hongo empieza a extenderse rápidamente por todo el tejido del hospedante tanto intra e intercelular, matando a las células hospedantes y la disolución de las paredes celulares antes de la infección. Esto es similar a la fase necrotrofica en los hemibiotrofica intracelulares. Sin embargo, este tipo de estrategia de infección no está asociada con la producción de micelios primarios y secundarios morfológicamente distintos (Peres *et al.* 2005; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

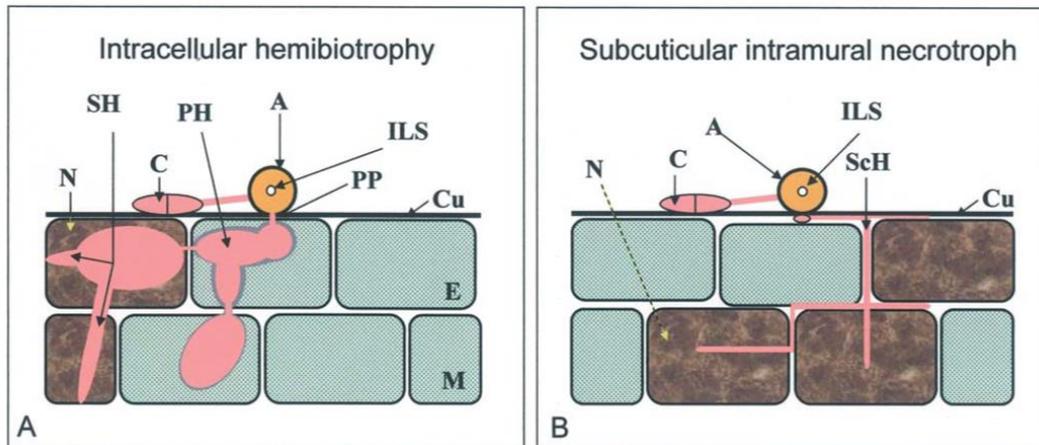


Figura 4. Estrategias de infección adoptadas por especies de *Colletotrichum*.
A, Infección intracelular hemibiotrófica. **B,** Infección necrotrofica intramural subcuticular . Conidio (C); apresorio (A); cutícula del huésped (Cu); punto de luz

interna (ILS); hifas primarias (PH); células epidérmicas (E); células del mesófilo (M); hifa secundaria (SH); subcuticular (ScH) (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

1.2.6 Evidencias de comunicación entre los organismos de la interacción

Hormonas y muchos reguladores de crecimiento están presentes en las plantas en cantidades muy pequeñas, sin embargo, actúan de una manera equilibrada para regular el crecimiento y desarrollo de la planta. Cualquier cambio en los niveles normales de fitohormonas, como los causados por la infección con patógenos, podrían alterar significativamente los procesos y la morfología fisiológica, lo que resulta en síntomas tales como retraso en el crecimiento, la formación de agallas, epinastia, y abscisión. Entre los reguladores del crecimiento, las auxinas (principalmente el ácido indolacético [IAA]) desempeñan un papel central en la regulación y el desarrollo del crecimiento de la planta, incluyendo la elongación celular y la diferenciación, la iniciación de la raíz, tropismos (fototrópico y gravitrópico), y la dominancia apical (Li *et al.*, 2003).

La caída prematura de los frutos de los cítricos causada por *Colletotrichum*, da lugar a una caída severa de frutos jóvenes, formación de cálices persistentes, y la distorsión de la hoja, lo cual implica que existen hormonas involucradas en el desarrollo de los síntomas. Estudios en cítricos han demostrado que el aumento en los niveles de IAA en respuesta a la infección por *Colletotrichum* puede estar asociado con la respuesta de defensa de la planta, ya que su aumento en flores afectadas puede ser resultado de la biosíntesis de *ново* por la planta hospedera y/o el patógeno fúngico (Li *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2014).

Los genes involucrados en la inducción y activación en la formación de IAA es la glucosa transferasa y el gen de la proteína GH3 como auxina sensible. Sin embargo, el aumento en niveles fisiológicamente altos de IAA en pétalos de flores de cítricos después de la infección puede provocar la caída del fruto joven así como contribuir al desarrollo de otros síntomas, tales como la formación de cálices

dilatados y distorsión de hojas con venas dilatadas (Li *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2014).

El etileno desempeña un papel fundamental en la regulación del desarrollo y en las respuestas de estrés en las plantas así como en la abscisión del fruto. La producción de etileno se regula a través de señales ambientales y endógenas mediante la expresión diferencial de genes de la ACC sintasa (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa) y la ACC oxidasa (1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa). Ambas enzimas ACC sintasa y ACC oxidasa se expresan diferencialmente en respuesta a diversos estímulos, incluyendo la infección por patógenos y la senescencia; Por ejemplo, la elevación de la transcripción génica de la ACC oxidasa está correlacionada con la colonización de patógenos y la participación del etileno en la caída de fruto joven causada por *Colletotrichum*. Asimismo, el incremento de etileno después de la infección fúngica también puede implicar una reacción de resistencia, esto debido a que el etileno actúa solo o a través de una interacción sinérgica con el jasmonato (JA) para promover la expresión de genes de defensa de la planta (Li *et al.* 2003; Peres *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2014).

El ácido abscísico (ABA) es un regulador terpenoide que se sintetiza en diferentes partes de la planta (hojas, tallos, raíces y frutos verdes), sin embargo su dominancia se establece en las semillas y otros órganos vegetales donde además ayuda a la planta a la adaptación a la escasez de agua (Murray, 2005). Aunque la aplicación del ABA exógeno puede promover la abscisión del fruto en cítricos, su papel en caída de frutos jóvenes aún permanece poco clara, por lo que se infiere que juega poco o ningún papel en la caída de frutos jóvenes causada por *Colletotrichum* (Li *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2014; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

JA y su éster metílico (metil JA) son moléculas importantes en la señalización de la planta inducidas por el estrés. Se ha demostrado que están implicadas en

diversas funciones fisiológicas de la planta, incluyendo el desarrollo reproductivo y la maduración del fruto, la inducción de defensa frente a patógenos e insectos, la protección contra el daño por ozono, la senescencia y actúan como reguladores de crecimiento. Sin embargo, se ha demostrado que causa la abscisión del fruto maduro en cítricos y también puede estar implicado en la caída del fruto joven causada por *Colletotrichum*. En la biosíntesis de JA, la enzima reductasa 12-oxo-PDA es el precursor biosintético y también puede servir como una señal efectiva, la rápida acumulación de ambos en pétalos de flores de cítricos puede conducir a reacciones defensivas que contribuyen a la respuesta del hospedante-patógeno (Li *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2014; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004).

Se conoce que los niveles de JA y ácido salicílico (SA) aumentan tras la infección por patógenos. La SA, una molécula de señalización en la planta, desempeña un papel importante en rutas implicadas con la resistencia a la enfermedad inducida por la regulación de muchos genes relacionados con la patogénesis, su acumulación se da en respuesta al ataque de hongos. Las vías dependientes de señalización de JA y SA están estrechamente interconectadas, y la diafonía entre éstas ha demostrado ser importante en la regulación de la expresión de genes de defensa. El papel del SA en la abscisión del fruto es desconocida, sin embargo, se ha demostrado su papel en la regulación de la expresión génica durante la senescencia de las hojas en *Arabidopsis* spp. Alternativamente, SA podría estar involucrado indirectamente en la caída del fruto joven interactuando con JA y otros reguladores del crecimiento, ya que SA es un inhibidor de la biosíntesis de JA y su acción (Li *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2014).

La defensa de la planta en respuesta al ataque microbiano, generalmente está regulado por una compleja red de vías de señalización donde están involucrados el SA, JA, y etileno. Estudios han demostrado que la respuesta de los pétalos de flores de cítricos a *Colletotrichum* spp. se asocia con el desequilibrio

hormonal y, probablemente, también una respuesta de defensa limitada que en consecuencia lleva a la abscisión del fruto joven. Se ha demostrado que la infección de *Colletotrichum spp.* en pétalos de flores de cítricos desencadena la acumulación significativa de IAA, etileno, JA, y 12-oxo-PDA, apoyando el papel de estos reguladores del crecimiento en el desarrollo de los síntomas y la progresión de la enfermedad (Li *et al.*, 2003; Peres *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2014).

1.2.7 Alteraciones fisiológicas en los participantes de la interacción

La antracnosis es una enfermedad producida por el hongo *Colletotrichum spp.* el cual causa la desintegración de los tejidos. Dentro de los síntomas se observan manchas negras y hundidas en forma de úlcera que aparecen sobre hojas, tallos, flores y frutos del limón mexicano. Pueden aparecer rayas de color marrón oscuro en la punta de las hojas. Prosperan en ambientes cálidos y húmedos. Al dificultar la fotosíntesis las hojas, se tornan amarillas y rugosas hasta su destrucción total (Agroalimentación, 2007). En los pétalos, el patógeno avanza intra e intercelular, y la penetración es directa y por aberturas naturales. Después de la invasión, acérvulos (cuerpos fructíferos asexuales) se observan en ambos lados de los pétalos, presentando los síntomas típicos como lesiones de color naranja-marrón. Las lesiones que llevan acérvulos rosa se expanden rápidamente en climas con alta humedad relativa y temperaturas óptimas (20-30 °C) y pronto invaden a todos los tejidos del pétalo por lo que a esta etapa de la enfermedad se llama muerte de las flores. Los pétalos arruinados permanecen firmemente unidos al disco basal y se vuelven duros, secos y de color marrón rojizo. En el estigma, se forman manchas necróticas de color marrón oscuro (Lin *et al.*, 2001), pero el patógeno no penetra a través de las células epidérmicas de la estigmatización. Una capa protectora lipófilo rico en compuestos fenólicos se forma debajo de la zona necrótica, y cristales de oxalato de calcio (CaOx) se producen donde el patógeno está presente. Después de la infección, los cambios hormonales dan lugar a la caída de frutos prematuros y retención del cáliz durante largos períodos (Rodríguez *et al.*, 2014).

Las plantas de cítricos producen compuestos orgánicos volátiles (COV) como metabolitos secundarios que juegan un papel importante en rutas de interacción con los microorganismos. En las plantas de cítricos, la cantidad de COVs es variable y depende de la edad y el tipo de órgano. Por ejemplo, en el pericarpio de frutos verdes, el aceite se compone de β -pineno, sabineno y linalol, mientras que en frutos maduros, los aceites prevalentes son R-limoneno y linalol. En pétalos, los aceites incluyen terpenos R-limoneno, mirceno, sabinine, linalol, terpineol, entre otros. Hasta la fecha, no hay evidencia del sitio donde se producen y donde se emiten los compuestos volátiles en los pétalos de los cítricos. En muchas familias, los sitios donde se sintetizan se llaman osmóforos o glándulas odoríferas. Los COV se produce de forma natural en las plantas y puede estar asociados con los mecanismos de defensa bioquímicos constitutivos (Rodríguez *et al.*, 2014).

La menor tasa de infección de las yemas florales pequeñas (menores a 8 mm) causadas por *C. acutatum* puede estar asociada con la presencia de cristales de CaOx en los primordios de los pétalo. La degradación de cristal produce H₂O₂ en puntos específicos en el tejido y juega un papel importante en la muerte celular programada, que actúa eficazmente en el control de patógenos. La aplicación de Ca en grandes cantidades conduce a la formación de cristales intracelulares de CaOx y, en consecuencia, son más resistentes a la infección causada por *C. acutatum* (Rodríguez *et al.*, 2014).

1.2.8 Biología y genética molecular

Los métodos tradicionales para la identificación de especies de *Colletotrichum* se basan principalmente en diferencias morfológicas tales como el color de la colonia, tipo de micelio, tamaño y forma de los conidios, aspecto de masas conidiales, forma del apresorio, temperatura óptima, índice de crecimiento, presencia o ausencia de setas, existencia del teleomorfo *Glomerella*, entre otros (Agrios, 2010; Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004). En el caso de *C. acutatum* en

limón mexicano, las colonias del hongo registran micelio algodonoso, compacto, de aspecto polvoriento y color blanco grisáceo. Su aspecto general es de color naranja ligero y en el centro se observan masas conidiales dispersas de color naranja a salmón. Los conidios son hialinos, unicelulares y poseen una elevada proporción de conidios con un lado redondeado y el otro fusiforme, en relación a los conidios con ambos lados redondeados. Los apresorios son de forma redonda.

En la actualidad, el uso de la tecnología basada en el ADN ha permitido contar con nuevas herramientas para la investigación de la variación genética y de los genes que controlan la patogenicidad y especificidad en hongos fitopatógenos (Orozco-Santos *et al.*, 2006).

Colletotrichum acutatum es un hongo fitopatógeno causante de la antracnosis, una enfermedad de amplia gama en las plantas. A través de estudios con marcadores moleculares RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) se encontraron dos patotipos: Antracnosis del Limón mexicano (KLA) y caída prematura de los frutos (CPF). El patotipo KLA infecta a todas las partes del limón mexicano, causando síntomas de antracnosis. Los mecanismos implicados en la abscisión de frutos jóvenes están involucrados con una serie de modificaciones fisiológicas causada por un desequilibrio de hormonas vegetales y/o reguladores de crecimiento (Orozco-Santos *et al.*, 2006).

Se ha identificado que el gen PacC^{KLAP2} juega diversos roles en la biosíntesis de toxinas de hongos y metabolitos secundarios y regula genes implicados en el desarrollo de hongos y su virulencia. Este gene es necesario para que *Colletotrichum acutatum* genere virulencia en hojas de lima y pétalos en las flores de los cítricos (Bang-Jau y Kuang-Ren, 2007).

De acuerdo a estudios realizados por Li *et al.* (2003), el Cuadro 2 muestra los genes clonados usados en estudios para patrones de expresión en flores de cítricos

infectados por *C. acutatum* en el cual se indica su identidad y la función que desempeñan en la interacción planta-patógeno.

Cuadro 2. Genes clonados usados en estudios para patrones de expresión en flores de cítricos por *C. acutatum* (Li *et al.*, 2003).

No. Clones	Tamaño (bp)	Identidad	Función	Secuencia
21	378	UDP-glucosa Ácido salicílico Glucositransferasa IAA glucosa transferasa	Transforma glucosa a ácido salicílico y IAA	AAF61647
26	716	Policagalacturonasa	Despolimerización de la pared celular	AF095577
38	458	Quitinasa	Defensa de la planta	AAC35981
62	377	Amino ácido hidrolasa IAA	IAA libre de Conjugado	CAA09330
64	380	ACC Oxidasa	Biosíntesis de etileno	BAA19605
69	732	Serina/ treonina quinasa	Señal de transducción	AAF26468
81	477	Supuesta proteína relacionada con la maduración	No se conoce	CAB85628
89	731	Endo- β -1,3-glucanasa	Proteína PR	T05262
102	264	Auxina responsable de la proteína-GH3 similar.	No se conoce	AAD32141
159	510	12-oxofitodienoate reductasa	Biosíntesis JA	AAC78441
213	231	Nucleasa inducida por senescencia	No se conoce	AAD00694

243	347	Expansión	Crecimiento de la pared celular y despolimerización	AAC33530
258	212	β -galactosidasa	Despolimerización de la pared celular	P48981

1.2.9 Control

Las medidas para el control de *Colletotrichum* spp. incluyen el aprovechamiento de resistencia de cultivares, manejo del cultivo, métodos de control químico y biológico, así como modelos de predicción de las enfermedades (Wharton y Diéguez-Uribeondo, 2004). La importancia de estas estrategias es fundamental durante la fase productiva y durante la postcosecha (Pegg *et al.*, 2007).

El control cultural es de suma importancia, ya que permite reducir la intensidad de la enfermedad en campo. Algunas de las acciones que se recomiendan para reducir las fuentes de inóculo son: uso de plantas certificadas, fertilizaciones adecuadas, eliminación de hojas y frutos enfermos, podas de brotes vegetativos, erradicación de malezas y el diseño de un adecuado sistema de riego.

Dentro del control químico, los fungicidas más utilizados pertenecen al grupo de los Benzimidazoles (Benomilo, Thibendazol y Carbendazim). Sin embargo, debido al uso indiscriminado de estos productos se ha reportado resistencia de *Colletotrichum* a los Benzimidazoles (FRAC, 2014, Gutiérrez y Gutiérrez, 2003). Existen grupos alternativos para el control de antracnosis como lo son los Triazoles (Hexaconazol, Propiconazol, Triadimefon), Imidazoles (Prochloraz e Imizalil), Estrobilurinas (Azoxistrobin, Trifloxystrobin) y Protectantes (Clorotalonil, Mancozeb y Oxiclورو de cobre) que permiten utilizar rotación de productos para minimizar el riesgo de generar resistencia (Nieto *et al.*, 2003). Asimismo, la inmersión de frutos en agua caliente con Imizalil o Prochloraz o la combinación de estos fungicidas, se

ha implementado para el control de enfermedades en postcosecha (Acosta *et al.*, 2003).

La aplicación de fungicidas puede prevenir la infección cuando son aplicados a tiempo, por lo que es el factor más importante para el manejo de la enfermedad (Brent y Hollomon, 1998). En México, el control de la antracnosis se basa en el uso de fungicidas preventivos como benzimidazoles y estrobilurinas (Anesiadis *et al.*, 2003; Becerra-Leor, 1995; Miles *et al.*, 2004; Slawewski *et al.*, 2002; Téliz y Mora, 2007; Vega, 1994).

1.3. REFERENCIAS CITADAS

- Acosta, R.M., Noriega, C.D.H., Nieto, A.D. y Téliz, O.D. 2003. Efecto del manejo integrado del mango (*Manguifera indica* L.) en la incidencia de enfermedades y en la calidad de frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 46-55.
- Agrios, N.G. 2010. *Fitopatología*. 2da edición. Limusa. D.F., México.
- Agroalimentación. 2007. ¿Cómo se defiende la fresa del ataque de un hongo? Consultado el 05 de Abril de 2015 de [http://www.andaluciainvestiga.com/banners/incita07/documentos/PATOSISTEMA DE *Citrus aurantifolia*- *Colletotrichum* spp.tos/agr.pdf](http://www.andaluciainvestiga.com/banners/incita07/documentos/PATOSISTEMA DE Citrus aurantifolia- Colletotrichum spp.tos/agr.pdf)
- Anesiadis, T., Karaoglanidis, R., and Klonari, K.T. 2003. Protective, curative and eradicant activity of the strobilurin fungicide azoxystrobin against *Cercospora beticola* and *Erysiphe betae*. *Journal of Phytopathology* 151: 647-651.
- Arzanlou, M., Bakhshi, M., Karimi, K., & Torbati, M. (2015). Multigene phylogeny reveals three new records of *Colletotrichum* spp. and several new host records for the mycobiota of Iran. *Journal of Plant Protection Research*, 55(2), 198-211.
- Bailey, J.A. (1992). *Colletotrichum*: biology, pathology and control. British Society for Plant Pathology, London: 04; QK625, B35.
- Bang-Jau, Y. y Kuang-Ren, C. 2007. Phenotypic characterization of mutants of the citrus pathogen *Colletotrichum acutatum* defective in a PacC-mediated pH regulatory pathway. *FEMS Microbiol Lett* 277, 107–114.
- Becerra, L. (1995). Enfermedades del cultivo de mango. *La producción de mango en México*. Editorial Limusa. México, 83-101.

- Brent, K. J., and Hollomon, D.W. 1998. Fungicides resistance: How can it be managed? Global Crop Protection Federation. Global Crop Protection Federation and Fungicides Resistance Action Committee. Monograph No. 2. United Kingdom. 48.
- Chomé, P. M. 2011. Las variedades de Cítricos. El material vegetal y el registro de variedades comerciales de España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 11-50.
- Crouch, J., O'Connell, R., Gan, P., Buiate, E., Torres, M.F., Beirn, L., Shirasu, K. & Vaillancourt, L. (2014). Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens. The genomics of *Colletotrichum*. Springer, 69-102.
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1), 37–113.
- FAO. 2014. Producción de limas y limones. Consultado el 15 de Agosto de 2017 de <http://www.fao.org/faostat/es/#compare>
- FAO. 2016. Principal producción de limas y limones a nivel mundial. Consultado el 15 de Agosto de 2017 de <http://www.fao.org/3/a-i5558e.pdf>
- FRAC. 2014. FRAC Code List ©*2014: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering), en Línea. P. 10. Consultado el 13 de diciembre de 2014. <http://www.frac.info/publication/anhang/2014%20FRAC%20Code%20List.pdf>

- González-Mateos R., V. Volke-Haller, J. González-Ríos, M. Ocampo-Portillo, C. A. Ortiz-Solorio y F. Manzo-Ramos. 2007. Efecto de la erosión del suelo sobre el rendimiento de maíz de temporal. *Terra Latinoamérica* 25 (4): 399-408.
- Gutiérrez, A.O. y Gutiérrez, A.J.G. 2003. Evaluación de resistencia a Benomil, thiabendazol y azoxistrobin para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(2): 228-232.
- León, J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Editorial IICA. Lima, Perú.
- Li, W., Yuan, R., Burns, J., Timmer, L. y Kuan-Ren, C. 2003. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128(4): 578-583.
- Miles, A.K., Willingham, S.L. and Cooke, A.W. 2004. Field evaluation of strobilurins and a plant activator for the control of citrus black spot. *Australian Plant Pathology* 33: 371-378.
- Murray, W. (2005). Introducción a la botánica. Editorial Pearson 744.
- Nieto, A.D., Gutiérrez, A.J.G., Gutiérrez, A.O., Téliz, O.D, Zavaleta, M.E, Delgadillo, S.F y Vaquiera, H. 2003. Evaluación de resistencia a Imazalil, Prochloraz y Azoxystrobin en aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz y Sacc. y control de la antracnosis del mango. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 379-383.
- Orozco-Santos, M., Medina- Urrutia, V., Robles-González, M., Orozco-Romero, J. Pérez-Zamora, O., Velázquez-Monreal, J., Timmer, L., y Guzmán-González,

- S. 2006. Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. *INIFAP, Folleto Técnico*, (2), 5-56.
- Orozco-Santos, M., Manzo-Sánchez, G., Guzmán-González, S., Farías-Larios, J., y Timmer, L.W. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:423-428.
- Pegg, K.G., Coates, L.M., Korsten, L. y Harding, R.M. 2007. Enfermedades foliares del fruto y suelo. In: El palto. Botánica, Producción y Usos. Wiley, A. W., Schaffer, B. y Wolstenholme, B. N. (eds.). Ediciones *Universitarias de Valparaíso*: 25-45.
- Peres, N., Timmer, L., Adaskaveg, J. y Correl, J. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*. 89 (8): 784-796.
- Robles, L. 2015. Caracterización morfológica, molecular, patogenicidad cruzada y resistencia a productos químicos en aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de aguacate a nivel nacional. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Rodríguez, J., Amorim, L., Silva-Junior, G., Bellato, M. y Appezzato-da, B. 2014. Structural and biochemical characteristics of citrus flowers associated with defense against a fungal pathogen. *AoB PLANTS* Advance Access: 7.
- Secretaría de Desarrollo Rural, 2005. Paquetes tecnológicos para el cultivo de Limón en el Estado de Colima. Diciembre No. 4.
- Scora, R. W. 1988. Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated citrus. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1, 277-289.

SIAP, 2015. Anuario estadístico de la producción agrícola. Consultado el 11 de Septiembre de 2017 de http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp

Slawecki, R.A., Ryan, E.P. and Young, D.H. 2002. Novel fungitoxicity assays for inhibition of germination associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. *Applied Environmental Microbiology* 68:597-601.

Téliz, O.D. y Mora, A.J.A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. Ed. Mundi Prensa México, S. A. de C. V. 2a Ed. 321.

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

Vega, P.A. 1994. Enfermedades del mango (*Mangifera indica* L.) en el valle de Apatzingan, SARH-INIFAP. Mexico. 26.

Wharton, P. y Diéguez-Uribeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *In Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61, 1: 3-22

Yang Y.L., Liu, Z., Cai, L. and Hyde, K.D. 2012. New species and notes of *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity* 39: 123-146.

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp. AISLADO DE LIMÓN MEXICANO Y PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

GONZÁLEZ-ZAVALA, Sandra¹, ESPINOSA-VICTORIA, David¹, NIETO-ÁNGEL, Daniel¹, GÓMEZ-RODRÍGUEZ, Olga¹, CARCAÑO-MONTIEL, Moisés².

¹ Programa de Edafología y Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, y ² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

RESUMEN

La antracnosis en limón mexicano es causada por *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. La enfermedad se presenta en todas las etapas fenológicas del cultivo sin embargo, en épocas con lluvias frecuentes existe mayor incidencia ya que el clima y las condiciones ambientales son adecuados para su desarrollo. En la presente investigación se identificaron aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de tejidos de limón mexicano con síntomas de antracnosis colectados en Tomatal, municipio de Iguala de la Independencia, Guerrero. Se realizó la identificación molecular la cual mostró dos especies de *Colletotrichum* spp., una corresponde a *C. gloeosporioides* y la otra a *Colletotrichum* sp. Las pruebas de patogenicidad mostraron que frutos y hojas jóvenes son más susceptibles al ataque de *Colletotrichum* spp.

Palabras clave: Antracnosis, Identificación molecular, Patogenicidad.

CHAPTER II

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Colletotrichum* SPP. ISOLATED FROM MEXICAN LEMON AND PROOF OF PATHOGENICITY

ABSTRACT

Anthrachnose in Mexican lemon is caused by *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*. The disease occurs in all the phenological stages of the crop however, in times with frequent rains, there is a greater presence since the climate and environmental conditions are adequate for its development. In the present research isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from Mexican lemon tissues with symptoms of anthracnose collected in Tomatal, municipality of Iguala de la Independencia, Guerrero were identified. Molecular identification showed two species of *Colletotrichum* spp., one correspond to *C. gloeosporioides* and the other to *Colletotrichum* sp. The proof of pathogenicity showed the fruits and young leaves are more susceptible to attack of *Colletotrichum* spp.

Key Word: Anthracnose, Molecular Identification, Pathogenicity.

2.1 INTRODUCCIÓN

Originalmente, *Colletotrichum gloeosporioides* fue descrito por Almeida en 1899 como *Gloeosporium*, sin embargo, fue reclasificado como *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. et Sacc. (Arx, 1970), cuyo telemorfo corresponde a la especie *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. et Schrenk (Tamayo, 2007).

El género *Colletotrichum* se encuentra clasificado en el Reino Fungi, *Phylum* Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden aún no asignado, Familia Glomerellaceae (Catalogue of life, 2014). Por otro lado, la fase sexual, *Glomerella*, se clasifica en el *Phylum* Ascomycota, clase Ascomycetes, subclase Sordariomycetidae, familia Glomerellaceae (Kirk *et al.*, 2001).

Las especies de *Colletotrichum* son identificadas mediante las características morfológicas, es decir, la forma de los apresorios y conidios, por la presencia o ausencia de setas, el crecimiento radial, así como la bioquímica y la patogenicidad (Riegel *et al.*, 2010; Freeman y Katan, 1997). Sin embargo, Wharton y Diéguez-Uribeondo (2004) indican que, a través de la identificación molecular, se obtiene mayor precisión en la identificación, puesto que el conocimiento sobre aspectos claves de su biología es aún reducido.

Algunas de las dificultades en la identificación morfológica de *Colletotrichum* se han presentado al caracterizar la forma de los conidios. Nirenberg *et al.* (2002) señala que la forma básica de los conidios producida por especies de *Colletotrichum* es curvada o cilíndrica, sin embargo, Damm *et al.* (2012) menciona que la característica más conocida de *C. acutatum* es la forma de los conidios con extremos agudos, aunque también se ha observado que en cepas sub-cultivadas repetitivamente presentan otras formas, en especial cilíndrica con un solo extremo agudo. No obstante, estas formas de conidios pueden presentarse en otras especies de *Colletotrichum*.

Estudios realizados por Riegel *et al.* (2010) mostraron la similitud estrecha que existe entre *C. lupini* y *C. acutatum*, así como su difícil discriminación, la cual es posible de forma rápida e inequívoca mediante el uso de ITS-RFLP y las enzimas Bsh 12361 y Tru1I, contrario con la especie *C. gloeosporioides* la cual es más fácil identificar.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal y aislamiento fúngico de *Colletotrichum* spp.

Se colectaron muestras de tejido (hojas, ramas, flores y frutos) aleatoriamente de limón mexicano con presencia de síntomas de antracnosis en la huerta localizada en el ejido “El Tomatal”, municipio de Iguala de la Independencia, Guerrero. El huerto se estableció en Junio del 2014, con plantas provenientes de un vivero certificado de Oaxaca, las cuales fueron proporcionadas por el Consejo Estatal de Limón. La variedad injertada es limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en patrón *Citrus macrophylla*, cuenta con sistema de riego por goteo semanal y son sometidos a control de fumigación con oxiclورو de cobre y azufre elemental.

Para el aislamiento de los hongos, los fragmentos de tejido fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min, lavados 3 veces con agua destilada estéril y secados a temperatura ambiente. Los fragmentos de tejido vegetal fueron depositados en medio Agar Dextrosa y Papa (Bioxon, PDA, 39 g L⁻¹ de agua), con cuatro fragmentos por caja de Petri e incubados a 28 °C (Oliveira *et al.*, 2005). Los aislamientos obtenidos se purificaron mediante cultivos monospóricos en medio PDA y fueron conservados en glicerol al 70% (v/v) a -70°C.

2.2.2 identificación morfométrica

Discos de PDA de 5 mm de diámetro del margen de colonias de 7 días de edad se transfirieron al centro de cajas Petri (90 x 15 mm) con PDA y jugo de verduras V-8, posteriormente se incubaron a 28°C. Se evaluaron tres réplicas por aislado durante 24 días y se realizaron mediciones cada 48 h para medir su crecimiento en dos diferentes medios de cultivo: PDA y V8.

La morfometría de los conidios se realizó a partir de colonias de 7 días de crecimiento. Se realizaron preparaciones de cada aislamiento con una muestra de micelio y se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada estéril para medir 100 conidios por aislado los cuales se observaron y foto documentaron en un microscopio compuesto Velab con el objetivo 100X y con ayuda del programa Motic plus, versión 2 (Motic, USA) y GIMP versión 2.8.

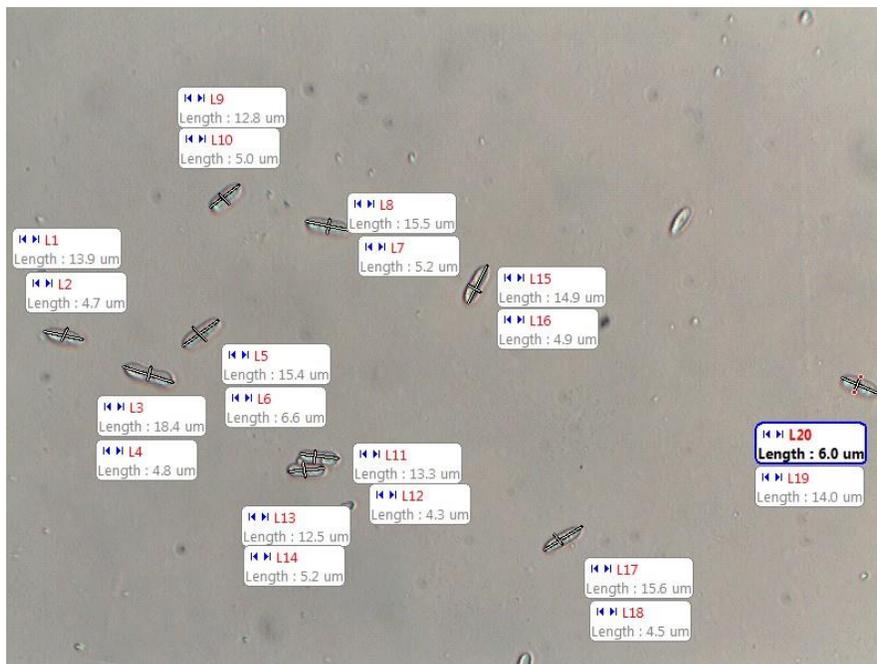


Figura 5. Medición de conidios de *Colletotrichum* spp.

.2.3 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

2.3.3.1 Extracción de ADN y PCR

La extracción se realizó mediante el método CTAB 2% y acetato de sodio (Doyle & Doyle, 1987). El ADN obtenido de los aislamientos se amplificó mediante la técnica de PCR utilizando los iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La separación de productos amplificados de PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio, visualizados bajo luz UV y fotografiados mediante el sistema de imágenes BioSpectrum. La secuenciación de los productos amplificados se llevó a cabo con el método de Sanger en la empresa MacroGen (Korea).

2.3.3.2 Análisis de secuencias

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas con el programa (BioEdit) y comparadas con secuencias de referencia extraídas del banco de datos del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI). Las secuencias se alinearon para elaborar un árbol filogenético. Las distancias de las matrices de las secuencias de alineamiento fueron calculadas usando el modelo Kimura-2 (Kimura, 1980) y analizados con el algoritmo Neighbour-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) usando MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) v. 6.06. Las secuencias en estudio se compararon con 24 secuencias de referencia por ser las más relacionadas genéticamente y utilizando *Monilochaetes infuscans* como grupo externo en el análisis.

2.3.3.3 Pruebas de patogenicidad

Las muestras de tres edades diferentes de hojas y frutos asintomáticos de limón mexicano (*C. aurantiifolia*, Swingle) fueron colectadas en el ejido de Tomatal evitando posibles daños físicos (Figura 6). Para los ensayos en hoja se inoculó una suspensión de conidios (10^6 conidios/mL) obtenidas de aislamientos de 6 días de edad en cajas de Petri en medio harina de maíz. Se colocaron dos gotas de $10 \mu\text{L}$ de suspensión de esporas en los extremos de la nervadura. El ensayo en frutos se realizó mediante dos métodos: con herida y sin herida, inoculando en ambos una gota de $10 \mu\text{L}$ de la suspensión de esporas (10^6 conidios/mL). Las muestras se colocaron en cámaras húmedas para obtener la humedad relativa adecuada. Se registró el tamaño de lesiones necróticas cada 24 hrs después del tercer día de la inoculación.

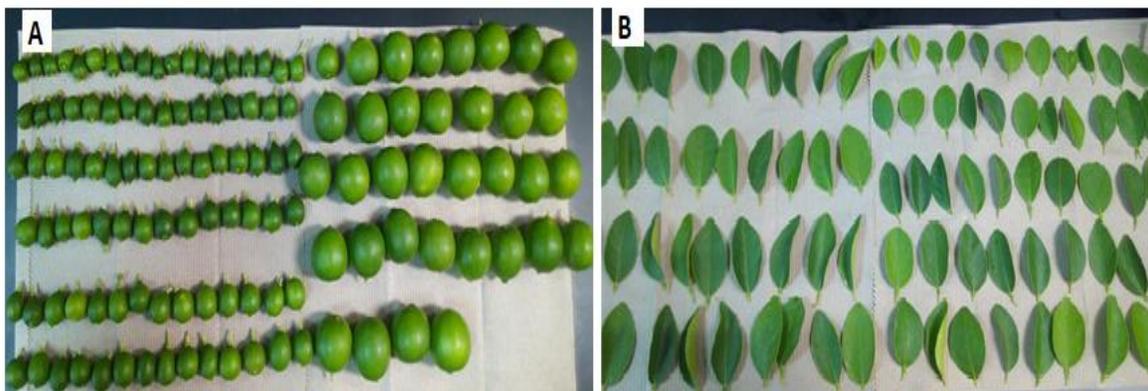


Figura 6. A. Frutos asintomáticos de limón de tres edades diferente; B. Hojas asintomáticas de limón de tres edades diferente.

2.2.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para la medición de los conidios así como de las pruebas de patogenicidad en hojas y frutos aislados de limón mexicano. Se utilizó el modelo experimental de clusters para la medición de conidios y un modelo

experimental factorial en bloques en los tratamientos de frutos y un experimento simple en bloques para los ensayos con hojas usando el paquete de análisis estadístico SAS® System for Windows V9, 2002.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

2.4.1 Aislados fúngicos.

Se obtuvieron un total de 20 aislamientos del tejido vegetal de limón mexicano. Debido a la similitud entre sus características morfológicas fueron seleccionaron 12 de ellos para realizar la presente investigación. Se identificaron dos especies, *Colletotrichum gloeosporioides* presentó colonias de crecimiento rápido y conidios con extremos circulares y otra especie de crecimiento lento y conidios de formas variables, de extremos circulares y algunos agudos similares a los conidios de *C. lupini* o *C. acutatum*, sin embargo ambas especies presentan alta homogeneidad en sus características morfológicas (Riegel *et al.*, 2010) por lo cual no se obtuvo su identidad. Es importante mencionar que la taxonomía de *C. acutatum* ha sido revisada extensamente mediante diferentes genes que han permitido la descripción de nuevas especies en la colección de aislados que han sido identificados como *C. acutatum* (Shiva y Tan, 2009), por lo que es indispensable realizar más estudios que permitan una clara identificación.

2.4.2 Identificación morfométrica

Todos los aislados crecieron bien en los medios de cultivo PDA (Figura 7) y V-8 (Figura 8). Orozco- Santos *et al.* (2004) demostraron que los medios de cultivos sólidos en los que la raza KLA obtuvo mejor crecimiento son PDA y solución nutritiva de glucosa, seguido por jugo de verduras V-8. Sin embargo, se observó que en medio V-8 los aislamientos crecían más rápido que en medio PDA. A los doce días,

el 56% de los aislados había cubierto el 100% de la superficie en el medio V-8, mientras que los aislamientos en PDA mostraron el mismo porcentaje a los dieciocho días de siembra. Andrades *et al.* (2009) reportaron que el 30% de sus aislados de *Colletotrichum* en solo 5 días cubrían del 50 al 100% de la superficie del medio en la caja de Petri. No obstante, estudios realizados por Villanueva-Arce *et al.* (2008) no encontraron diferencias en el crecimiento en PDA entre *C. fragariae* y *C. gloeosporioides*, por lo que concluyeron que esta variable no puede ser considerada como un factor de separación entre las dos especies.

La identificación mediante las características morfológicas se ha realizado utilizando diferentes medios de cultivo para observar el comportamiento del hongo de las especies de *Colletotrichum* spp. en cítricos. A pesar de ello, los estudios para su identificación se han detallado particularmente en medio de cultivo PDA, por lo que su uso es indispensable para evitar confusiones en el diagnóstico del hongo (Orozco- Santos *et al.*, 2004).

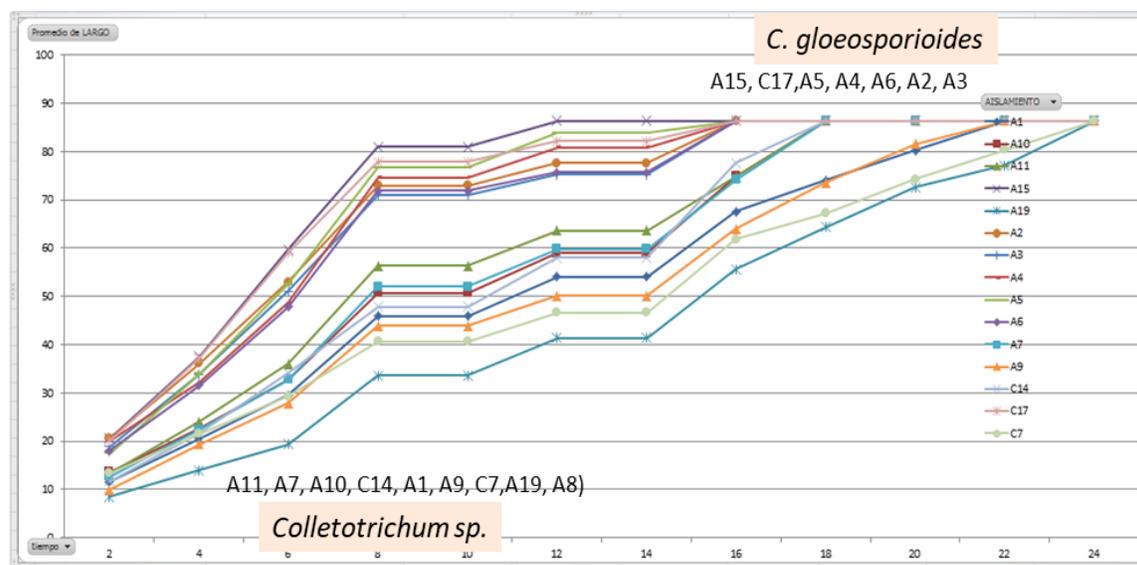


Figura 7. Crecimiento de *Colletotrichum* spp. en medio de cultivo PDA. Eje X corresponde al tiempo (en días) del crecimiento de *Colletotrichum* spp. Eje Y corresponde al área de crecimiento (mm).

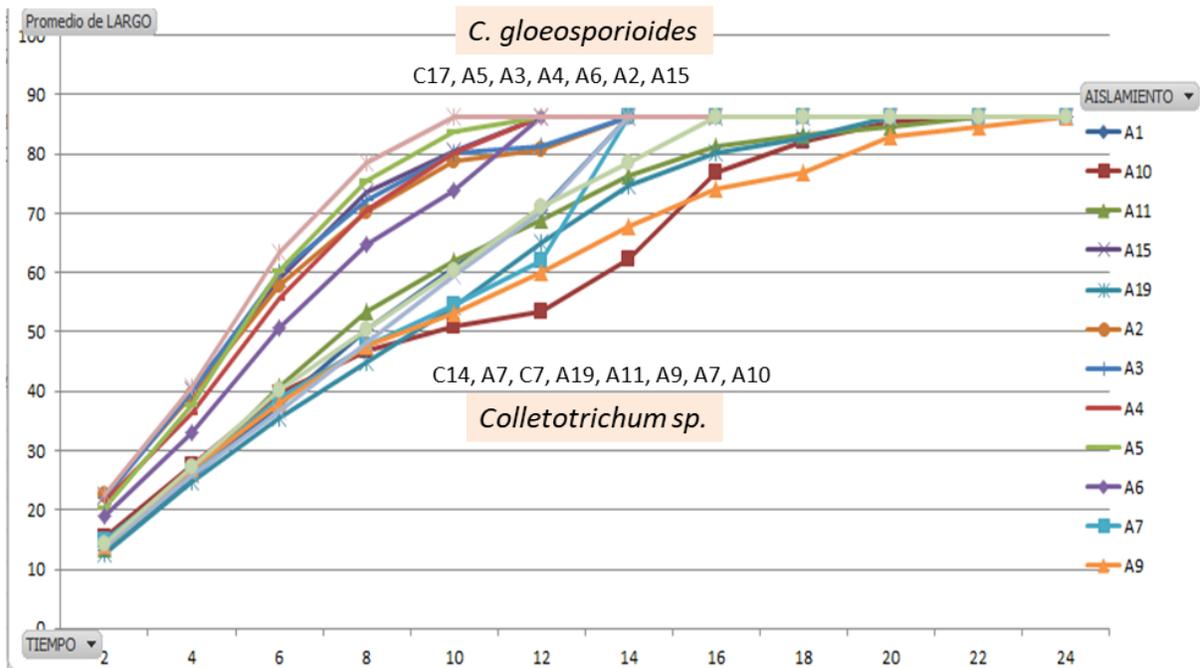


Figura 8. Crecimiento de *Colletotrichum* spp. en medio de cultivo V8. Eje X corresponde al tiempo (en días) del crecimiento de *Colletotrichum* spp. Eje Y corresponde al área de crecimiento (mm).

El análisis estadístico de la medición de conidios para la diferenciación de especies de *Colletotrichum* spp., fue comparada con el aislamiento C14 el cual ha sido previamente identificado como *C. acutatum*. La figura 9 muestra tres grupos de especies de los cuales ninguno de nuestros aislamientos de *Colletotrichum* spp. se alinea con la referencia de *C. acutatum*.

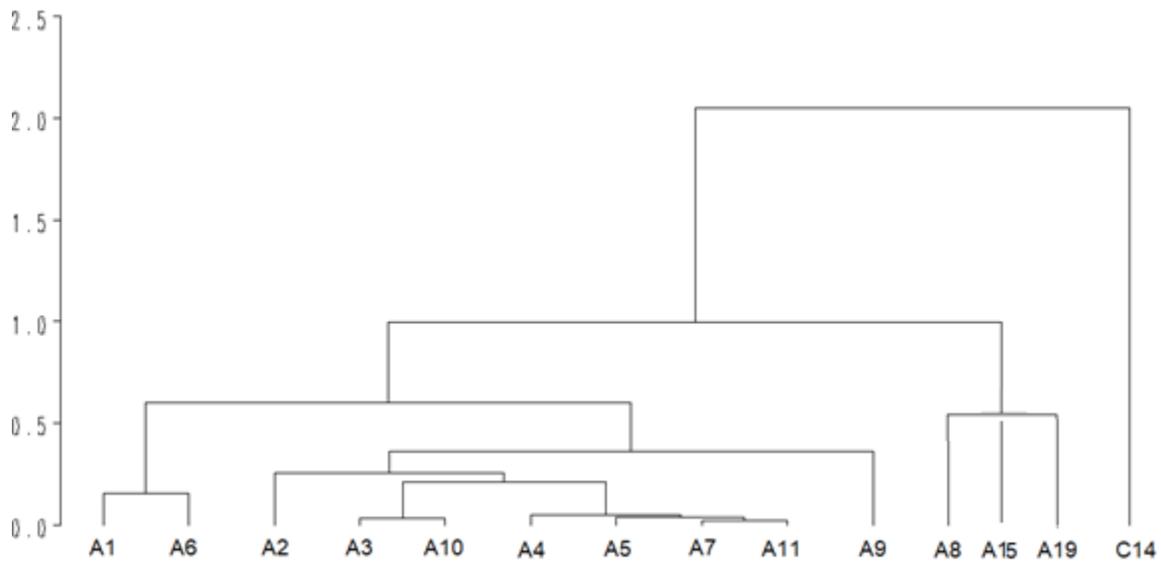


Figura 9. Separación de aislamientos mediante el análisis morfométrico de los conidios de *Colletotrichum* spp. Eje X corresponde a los aislamientos de *Colletotrichum* spp. Eje Y corresponde al área de los conidios (μm^2).

2.4.3 PCR y secuenciación del ADN.

Se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 550 pares de bases (pb) (Figura 10). La secuenciación de los productos de PCR, fueron alineados mediante el software Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) el cual mostro un 100% de identidad (valor de $E=0$) con *Colletotrichum gloeosporioides* (Acceso: KU136388.1) y otro grupo con el 99% de identidad (valor de $E=0$) a *Colletotrichum lupini* (Acceso: JQ936134.1) y *Colletotrichum acutatum* (Acceso: KT215297.1). Estudios realizados por Ruiz *et al.* (2014) mostraron una homología similar al comparar la alineación de sus secuencias en BLASTn, mostrando un 99% de identidad con respecto a *Colletotrichum acutatum* con respecto a las secuencias de referencias.

El análisis filogenético utilizando el software MEGA v. 6.06 confirmó que los aislamientos 2, 3, 4, 5, 6 y 15 pertenecen a *C. gloeosporioides* y los aislamientos 1,

7, 9, 10, 11 y 19 filogenéticamente son similares a *C. lupini* y *C. acutatum* (Figura 11). Estudios realizados por Riegel *et al.* (2010) mostraron la similitud estrecha que existe entre *C. lupini* y *C. acutatum*, así como su difícil discriminación; sin embargo, mediante el uso de ITS-RFLP y las enzimas Bsh 12361 y Tru1I fue posible su identificación rápida e inequívoca. Por lo que es necesario el uso de éstos para la identificación entre las especies de *Colletotrichum* spp.

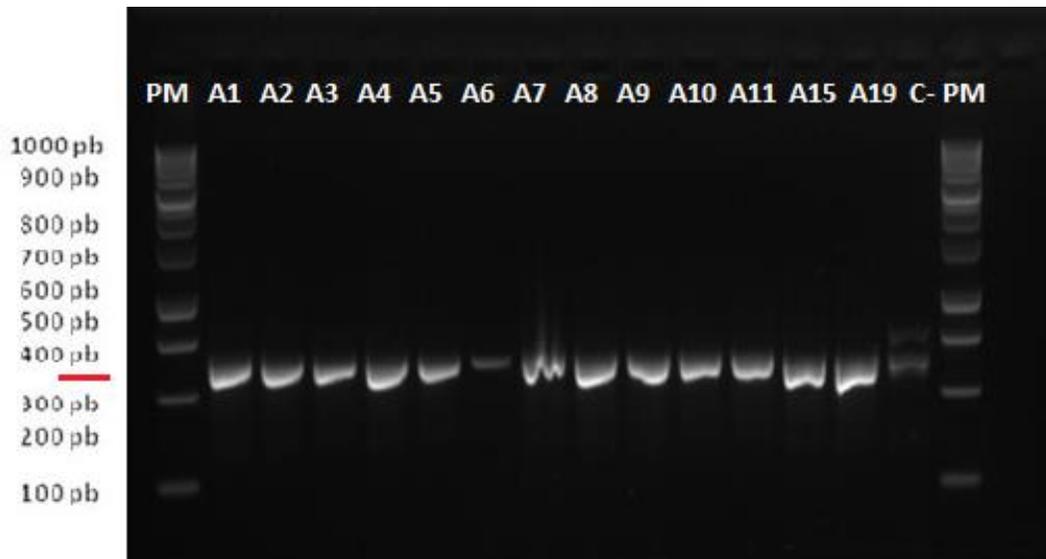


Figura 10. Fragmentos de PCR en gel agarosa (1.5%) obtenidos por la amplificación del ADN de los aislamientos de *Colletotrichum* provenientes de tejido de limón mexicano y control negativo (C-) utilizando los primers ITS5/ITS4.

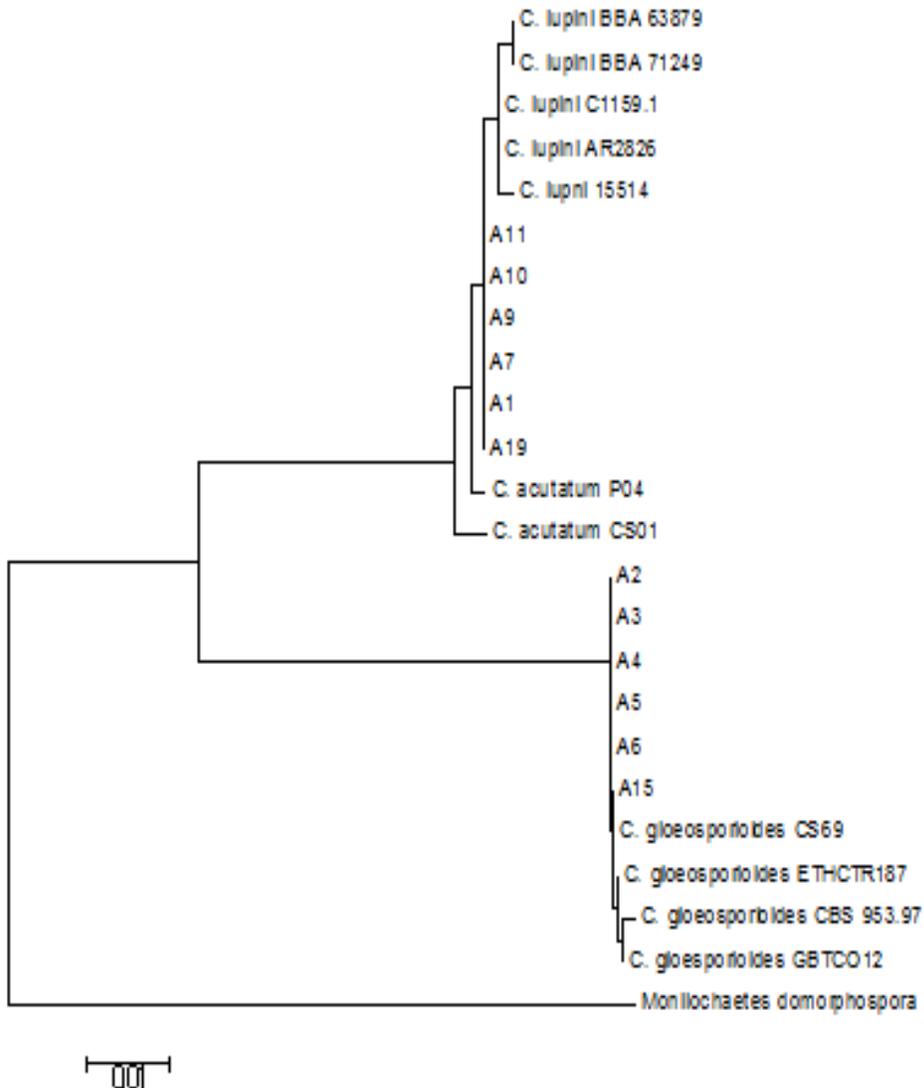


Figura 11. Árbol Neighbour-joining método Kimura- 2 de 24 secuencias ITS de los aislamientos de *Colletotrichum* spp.

2.4.4 Ensayos de patogenicidad y Síntomas de antracnosis en limón mexicano.

Se realizaron las pruebas con los 12 aislamientos de *Colletotrichum* sp. utilizando testigos positivos a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* previamente identificados. Todos los aislamientos fueron patógenos principalmente en hojas y frutos inmaduros (Fig. 12) los cuales mostraron presencia de lesiones 3 días

después de la inoculación. Estos resultados concuerdan con los presentados por Ruiz *et al.* (2014) en donde los aislamientos de *Colletotrichum* sp. mostraron ser altamente patógenos únicamente en hojas y frutos inmaduros, mostrando sus síntomas a los 6 días después de la inoculación en limón mexicano (Fig 13 y 14).



Figura 12. Síntomas de la enfermedad de antracnosis en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*, Swingle) en campo y resultados de las pruebas de patogenicidad. Tizón en ramas y muerte progresiva (A), fruto con presencia de lesión necrótica (B), hojas con lesiones necróticas y halos cloróticos (C), Racimo florar afectado mostrando necrosis en pétalos (D), Hojas afectadas por inoculación del patógeno (E, F) y frutos inmaduros afectados por inoculación del patógeno (G, H).

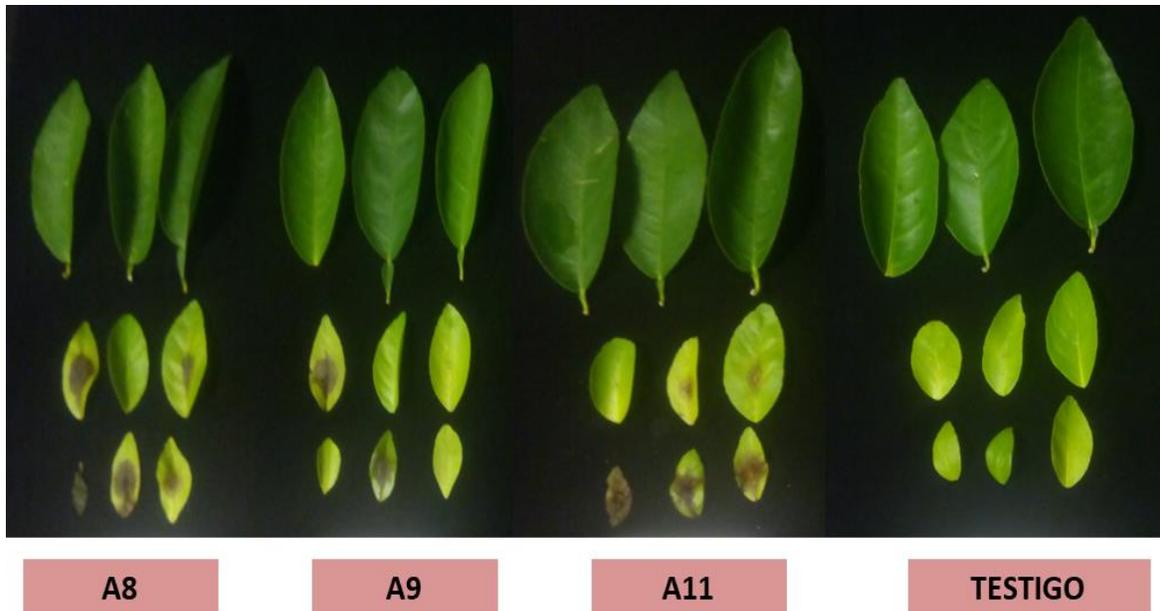


Figura 13. Síntomas en hojas en la prueba de patogenicidad de *Colletotrichum* spp. y aislamientos con mayor grado de virulencia en hojas de limón mexicano.

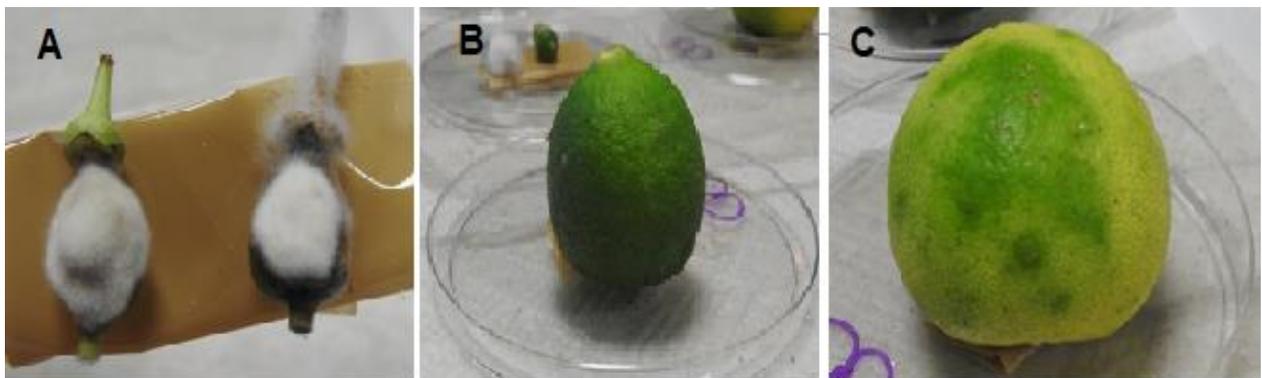


Figura 14. Síntomas en fruto en la prueba de patogenicidad de *Colletotrichum* spp. (A). Frutos pequeños, (B). Fruto mediano, (C) Fruto grande.

De acuerdo al análisis de Tukey en las pruebas de patogenicidad en limón mexicano, se puede concluir que los tratamientos con herida y sin herida no muestran diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que *Colletotrichum* spp. puede atacar a la planta de forma natural o con herida (Cuadro 3).

Cuadro 3. Área de lesiones causadas por *Colletotrichum* spp. en fruto de limón mexicano.

TRATAMIENTO EN FRUTO	AGRUPAMIENTO TUKEY	MEDIA
SIN HERIDA	A	2.9971
CON HERIDA	A	2.6596

Nota: Valores con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

Asimismo también podemos concluir que frutos y hojas inmaduras son más susceptibles al ataque de *Colletotrichum* spp. puesto que los frutos de tamaño mediano y grande no mostraron diferencias significativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparaciones de la lesión de *Colletotrichum* spp. de acuerdo a la edad del fruto.

TAMAÑO DE FRUTO	AGRUPAMIENTO TUKEY	MEDIA
CHICO	A	50.922
MEDIANO	B	4.078
GRANDE	B	3.608

Nota: Valores con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

También se realizaron comparaciones entre los aislamientos (Cuadro 5), sin embargo los resultados estadísticos nos muestran que los aislamientos tienen el mismo comportamiento, es decir, todos tienen el mismo grado de virulencia.

Cuadro 5. Comparación de virulencia entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. en frutos.

AISLAMIENTO	AGRUPAMIENTO TUKEY	MEDIA
A5	A	35.89
A1	A	33.11
C7	A	31.25
A19	A	28.32
A8	A	24.79
A10	A	24.14
C14	A	22.96
A9	A	21.79
A7	A	20.5
A2	A	18.89
A15	A	17.76
A11	A	14.36
A6	A	12.97
A3	A	8
C17	A	7.91
A4	A	1.16

Nota: Valores con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico en hojas (Cuadro 6) muestran que el tamaño de hoja más pequeño es más susceptible al ataque de *Colletotrichum* spp. esto se puede inferir a que cada tamaño de hoja es significativamente diferente con respecto a la prueba de Tukey.

Cuadro 6. Comparaciones de la lesión de *Colletotrichum* spp. de acuerdo a la edad de la hoja.

TAMAÑO DE HOJA	AGRUPAMIENTO TUKEY	MEDIA
CHICO	A	5.7339
MEDIANO	B	3.3856
GRANDE	C	1.2798

Con respecto a la virulencia entre los aislamientos de *Colletotrichum* spp. (Cuadro 7) podemos inferir que los aislamientos más agresivos son A9, A8 y A11 los cuales corresponden a la especie de *Colletotrichum* sp. no identificada.

Cuadro 7. Comparación de virulencia entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. en hojas de limón mexicano.

AISLAMIENTO	AGRUPAMIENTO TUKEY		MEDIA
A8	A		5.1435
A11	A		5.1138
A9	A		4.722
A19	A	B	4.1737
C14	A	B	4.0637
A7	A	B	3.928
A10	A	B	3.741
A3	A	B	3.6986
A2	A	B	3.4995
A6	A	B	3.1751
A5	A	B	3.1353
C7	A	B	3.0455
A1	A	B	2.9503
C17	A	B	2.5504
A15		B	1.6493
A4		B	1.5732

2.5 CONCLUSIONES

Se identificaron dos especies como agente causal de antracnosis en limón mexicano (*C. aurantifolia*, Swingle), una corresponde a *Colletotrichum gloeosporioides* identificado mediante los iniciadores ITS5/ITS4 y corroborado mediante el análisis filogenético. Sin embargo, para los aislados que podrían ser *C. acutatum* o *C. lupini* se necesitan realizar estudios adicionales con ITS-RFLP y enzimas Bsh 12361 y Tru1I para corroborar la especie a la cual corresponde. Las pruebas de patogenicidad mostraron que hojas y frutos jóvenes resultaron ser

susceptibles para todos los aislamientos, por lo que es indispensable realizar un manejo preventivo antes y durante la etapa de floración, para disminuir el riesgo de infección.

2.6 REFERENCIAS CITADAS

Andrades, I., Yender, F., & Labarc, J. 2009. Evaluation of anthracnose (*Colletotrichum* sp.) in *Annona muricata* L. Giant type in the sector Moralito, Zulia State, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(1), 148-157.

Arx, J. V. (1970). A Revision of the Fungi classified as *Gloesporium*. *Bibliotheca Mycologica*. Verlag von J. Cramer.

Catalogue of life 2014. Consultado en: <http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree>. Revisado el 13 de diciembre de 2014.

Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. 2012. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1), 37–113.

Kirk P. M, Cannon P. F, David J. C, & Stalpers J.A. 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 9th edn. CABI, Egham, UK.

Ruiz A, Parra CC, da Graça JV, Salas B, Malik NSA y Kunta M. 2014. Caracterización molecular y de ensayos de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, agente causal de la antracnosis del limón en Texas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 52-61.

- Riegel, R., Véliz, D., Baer, I., Quitral, Y. y Muñoz, M. 2010. Genetic diversity and virulence of *Colletotrichum lupini* isolates collected in Chile. *Tropical Plant Pathology*. Vol. 35, 3, 144-152.
- Tamayo, M.P.J. 2007. Enfermedades del Aguacate. Politécnica No. 4. *Medellín Colombia*: 51-70.
- Shiva RG., y Tan YP. (2009). A taxonomic re-assessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondii* sp. nov. *Fungal Diversity*, 39(111), e122.
- Villanueva-Arce, R., Yáñez-Morales, M.J. y Hernández-Anguiano, A.M. 2008. Especies de *Colletotrichum* en Chirimolla (*Annona cherimola* Mill.) *Agrociencia* 42: 689-701.
- Wharton, P. y Diéguez-Uribeondo, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 3-22.

CAPÍTULO III. MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS NATIVOS CONTRA *Colletotrichum* spp AISLADOS DE LIMÓN MEXICANO

GONZÁLEZ-ZAVALETA, Sandra¹, ESPINOSA-VICTORIA, David¹, NIETO-ÁNGEL, Daniel¹, GÓMEZ-RODRÍGUEZ, Olga¹, CARCAÑO-MONTIEL, Moisés².

¹ Programa de Edafología y Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, y ² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

RESUMEN

El uso irracional de químicos para el control de enfermedades y plagas ha propiciado la acumulación de tóxicos y la resistencia de patógenos en cultivos de interés comercial. La resistencia de patógenos ha generado la aplicación de dosis altas y el control deficiente de patógenos. Por ello, el control biológico es una alternativa sustentable debido a los mecanismos de acción que emplean los microorganismos. El presente trabajo tiene como objetivo aislar microorganismos que presenten inhibición contra *Colletotrichum* spp. en pruebas antagónicas *in vitro*. Estos hallazgos sugieren que existen microorganismos con capacidad para realizar antagonismo sobre *Colletotrichum* spp.

Palabras clave. Control biológico, mecanismos de acción, pruebas antagónicas.

CHAPTER III

NATIVE ANTAGONIST MICROORGANISMS AGAINST *Colletotrichum* spp ISOLATED FROM MEXICAN LEMON

ABSTRACT

The irrational use of chemicals for the control of diseases and pests has led to the accumulation of toxins and the resistance of pathogens in crops of commercial interest. The resistance of pathogens has generated the application of high doses and poor control of pathogens. Therefore, biological control is a sustainable alternative due to the mechanisms of action used by microorganisms. The objective of this research is to isolate microorganisms that show inhibition against *Colletotrichum* spp. in antagonistic tests in vitro. These findings suggest that there are microorganisms with the capacity to antagonize *Colletotrichum* spp.

Keywords. Biological control, mechanisms of action, antagonistic tests

3.1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos antagónicos tienen gran importancia en el control biológico debido a su acción interruptora sobre el desarrollo de patógenos. Los múltiples mecanismos de acción de los microorganismos antagónicos y su velocidad de crecimiento, evitan problemas de resistencia de los patógenos (Pal y McSpadden, 2006; Živković *et al.*, 2010). Cada uno de ellos posee diferentes modos de acción, algunos lo hacen por competencia, es decir, la interacción de dos o más microorganismos en un mismo medio, que compiten por nutrientes u oxígeno para poder subsistir, otros mediante micoparasitismo y lisis enzimática, antibiosis e inducción de resistencia (Fernández, O. y Vega, L., 2001).

De acuerdo con Fernández-Larrea y Vega (2001), los principales microorganismos antagónicos utilizados como agentes de control biológico en diferentes cultivos son: *Gliocladium roseum*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces noursei*, *Streptomyces natalensis*, *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum* y *Pseudomonas fluorescens*, los cuales en pruebas *in vitro* muestran resultados exitosos y también algunos resultados favorables en su aplicación en campo (Tortora *et al.*, 2011; Živković *et al.*, 2010; Freeman *et al.*, 2004).

Las especies que se han estudiado para el control biológico principalmente son aisladas del suelo. Reportes obtenidos por Mayea *et al.* (1991) y Giri *et al.* (2005), mencionan que los hongos más comunes en suelo corresponden a los siguientes géneros: *Acrostalagmus*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Gliocladium*, *Monila*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Spicaria*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Pilularia*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorynchus*, *Pythium*, *Chaetomium* y *Rhizoctonia*.

Otro de los microorganismos más estudiados para el biocontrol de patógenos son los actinomicetos. Los actinomicetos son bacterias filamentosas gram-positivas que se distribuyen ampliamente en el suelo. El mecanismo por el cual suprimen a los patógenos es mediante la producción de hidrolasas y antibióticos en la pared celular. La presencia de actinomicetos en la flora microbiana de la rizosfera parece ser importante en la capacidad de inhibir patógenos de plantas. Investigaciones han demostrado que los actinomicetos inhibe a patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Xanthomonas oryzae*, *Rhizoctonia solani* y entre otros patógenos de plantas (Li *et al.*, 2017).

El control biológico de antracnosis se ha reportado en el cultivo de manzanas (*Malus sylvestris* (L.) Mill. Var. *domestica* (Borkh)), aguacate (*Persea americana* Mill.) y mango (*Mangifera indica* L.). Los estudios que se han realizado del control biológico en postcosecha, han sido aplicados bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, por lo que las respuestas de efectividad en condiciones de campo son afectadas por factores tales como cambios de temperatura, humedad, luz ultravioleta e interacción con otros microorganismos. Por ello, uno de los mayores obstáculos del control biológico es su relativa inhabilidad para controlar infecciones establecidas en precosecha, como lo son las infecciones latentes. Asimismo, su aplicación en campo puede propiciar la colonización de la superficie del fruto y prevenir el establecimiento de infecciones latentes en los frutos de la huerta (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005).

Marois *et al.* (1981) observaron que algunas especies de *Penicillium*, además de ser fitopatógenos, también pueden ser importantes agentes de biocontrol. Diversos autores consideran a *P. oxalicum* como un prometedor agente fúngico (Huang y Kuhlman, 1991; Ownley y Benson, 1987; Pandey *et al.* 1993; Windeles y Kommedahi, 1978) debido a la producción de un amplio rango de polisacáridos y enzimas que degradan la pectina, glucanasas, celulasas, hemicelulasas, entre otras (Ikotun, 1984; Pérez *et al.*, 1982).

3.2 MECANISMOS DE BIOCONTROL

Se ha observado que los agentes antagonistas ejercen diversos mecanismos para el control de patógenos, los cuales se mencionan a continuación:

- **Competencia por nutrientes y espacio.** Es la capacidad de crecimiento y de obtención de nutrientes por parte del microorganismo antagonista, en el cual existe escases de un elemento. Generalmente, la competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio.
- **Antibiosis.** Se refiere a la producción de sustancias tóxicas por parte de un microorganismo como antibióticos en bajas concentraciones para inhibir el crecimiento o germinación de microorganismos patógenos.
- **Parasitismo.** Se refiere a la acción en el que un microorganismo parasite a otro, en otras palabras, el patógeno funge como alimento para su antagonista, en donde se ven implicadas enzimas extracelulares como quitinasas, celulasas, β -1,3 glucanasas y proteasas, las cuales lisan las paredes de las hifas, conidios o esclerocios de los patógenos (Bar-Shimon *et al.*, 2004)

En el Cuadro 8 se mencionan los microorganismos más estudiados como agentes de control biológico y sus diferentes mecanismos de acción.

Cuadro 8. Agentes de control biológico y sus mecanismos de acción (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006; Di Barbaro *et al.*, 2014; Freeman *et al.*, 2004; Santos-Villalobos *et al.*, 2012; Živković *et al.*, 2010).

AGENTES DE CONTROL	MODOS DE ACCIÓN
BIOLÓGICO	

<i>Streptomyces</i> (<i>S. noursei</i> y <i>S. natalensis</i>)	Producción de enzimas hidrolíticas extracelulares y metabolitos antifúngicos secundarios.
<i>Trichoderma</i> (T-39, T-105, T-161 y T-166)	Micoparasitismo (competencia por espacio y nutrientes con los hongos patógenos), antibiosis (micotoxinas), promoción de crecimiento e inducción de resistencia de la planta hospedante.
<i>Azospirillum brasilense</i>	Producción de metabolitos activos (ácido indol acético, citoquininas, giberelinas y sideróforos), que influyen positivamente sobre el crecimiento y desarrollo saludable de las plantas.
<i>Gliocladium roseum</i>	Competencia de nutrientes, micoparasitismo y antibiosis hacia patógenos de plantas.
<i>Bacillus subtilis</i>	Producción de metabolitos antibióticos que penetran la célula de patógenos e inhiben su actividad por oxición-química.

Actualmente la búsqueda de agentes de biocontrol ha aumentado significativamente. Por ejemplo, bacterias de género *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus*, generalmente son utilizadas para controlar plagas en raíces y áreas foliares y, éste último, también es considerado como colonizador eficaz en hongos y el más comercializado por EUA. Otra especie utilizada para estos fines es *Trichoderma*, el cual es el principal género utilizado en control de suelos (Fernández, O. y Vega, L., 2001), y por ello, han realizado productos comerciales para su venta en el mercado (Cuadro 9).

Cuadro 9. Biofungicidas con componente activo de bacterias u hongos comercializados en diferentes países, incluyendo los específicos para cítricos (Fernández y Juncosa, 2002).

AGENTE DE BIOCONTROL	PATÓGENO	PRODUCTO COMERCIAL
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Hongos (<i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>) y nematodos.	Blue Cirde (Stine Seeds), Deny (CTT Corp), Intercept (Encore Technologies).
<i>Pseudomonas siringe</i> ESC 10, 11.	Postcosecha (<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Geotrichum</i>)	Bio-save 100 y 1000. Bio-save 110 (Eco.Science).
<i>Pseudomonas aureofaciens Tx-1</i>	Antracnosis, <i>Pythium</i> , <i>Microchium</i> .	Spot-Less (Eco soil Systems, Inc.)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Aspergillus</i> , etc.	HiStick N/T (MicroBio Group), Serenade (AgraQuest, Inc.).
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , etc.	Kodiak (Gustafson), Bactophyt (NPO Vector) System 3.
<i>Trichoderma harziarum</i> KRL AG2	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Sclerotinia</i>	T-22G, T-22HB (Bioworks).
<i>Trichoderma harziarum</i>	<i>Botrytis</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Fulvia</i> , <i>Monilia</i> , etc.	F-Stop (Eastman Kodak), Supresivi (Borregaard Bio Plant).
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Armillaria</i> , <i>Botryosphaeria</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Nectria</i> , etc.	Trichomic (Trichodex), Trichopel, Trichoproject, Trichodowels, Tricoseal.
<i>Trichoderma ligonorum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	Trichodermin-3 (compañía rusa y búlgara)

<i>Trichoderma spp.</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> , <i>Sclerotium</i> , <i>Fusarium</i> .	Promot (J.H. Biotech, Inc.), Trichopel (Agrimm Biologicals).
Micorriza	<i>Botrytis</i> , <i>Pythium</i> .	Vaminoc (AGC Microbiol).
<i>Candida oleophila</i> 1-182	Postcosecha (<i>Botrytis</i> <i>spp.</i> , <i>Penicillium</i>).	Aspire Oncogen.

Estudios realizados por Mai *et al.*, (2012) demostraron que *Bacillus amyloliquefaciens* es uno de los microorganismos más estudiados para el control biológico por la formación de endoesporas al ser resistentes en condiciones ambientales, esto debido a que el S13-3 puede colonizar superficies de plantas debido a la propagación de células, acumulación y formación de biopelículas, además de destacarse por la producción de iturin A que actúa como fungicida al erradicar hongos fitopatógenos y reducir la severidad de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides*. Su uso reduciría la aplicación de productos químicos al utilizarse en un manejo integrado y ayudaría a prevenir la aparición de hongos fitopatógenos resistentes a fungicidas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Obtención de aislados

Los antagonistas se aislaron de muestras de suelo de la zona de estudio tomadas al azar a una profundidad de 30 cm. De cada muestra de suelo se agregó 1 g en 9 mL de agua destilada estéril, que posteriormente se diluyó hasta 10^5 . De cada dilución se tomó una alícuota de 15 μ L que se sembró en medio Agar Nutritivo (Bioxon, Agar nutritivo, 23 gL^{-1} de agua) y se incubó a 28°C durante 2 días. Se

obtuvieron 16 cepas bacterianas que fueron utilizadas para realizar el bioensayo *in vitro*.

3.2.2 Pruebas de antagonismo en placa

La determinación de la capacidad antagónica de las cepas aisladas frente a los hongos fitopatógenos se realizó mediante la técnica de enfrentamiento dual en placa (antagonista vs hongo) (Figura 15). El enfrentamiento se realizó mediante la siembra de cada una de las cepas por triplicado, ocupando un espacio de 3 cm desde el extremo de la caja de Petri en medio Agar Destroxa y Papa (PDA). Los aislamientos de *Colletotrichum* spp. se sembraron y fueron incubados a 25°C durante 7 días hasta la esporulación. Los discos con crecimiento de micelio (5 mm de diámetro) de los patógenos se colocaron a una distancia de 3 cm del extremo de la cepa antagónica y fueron evaluados cada 48 h. Se realizaron controles de viabilidad de cada hongo inoculado en los cuales se midió el crecimiento libre.

El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de las bacterias aisladas se estimó con la siguiente fórmula (Landro-Valenzuela *et al.*, 2013):

$$PICR = ([R2 - R1] * 100) / \overline{R1}$$

Donde:

R1: Crecimiento libre del patógeno.

R2: Crecimiento influenciado del patógeno vs antagonista.

$\overline{R1}$: Media del crecimiento del patógeno solo.

3.2.3 Identificación molecular

3.2.3.1 Extracción de ADN y PCR

La extracción se realizó mediante el protocolo WIZARD PROMEGA. El micelio se maceró con ayuda de un mortero, posteriormente se transfirieron a tubos de 2 ml. Se adicionaron 600 µl de Nuclei Lysis Solution y se incubaron a 37°C (baño María) por una hora. La solución se colocó a -20°C por 5 min. Se agregaron 100 µl de Protein Precipitation Solution, mezclándolo con vortex durante 20 seg. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. El sobrenadante (contiene el ADN) se transfirió a un tubo para centrífuga de 2 µl. Se agregaron 100 µl de isopropanol frío mediante inversión lenta, formando una visible masa de ADN. Se colocaron a -20°C por 24 h. Posteriormente la solución se centrifuga a 14,000 rpm por 5 min. Una vez finalizada la centrifuga, el sobrenadante fue desechado y se adicionaron 100 µl de etanol al 70% al pellet, centrifugando a 14,000 rpm por 5 min. Se repitió el paso anterior con la finalidad de hacer dos lavados al ADN. Los tubos se colocaron boca abajo con una sanita estéril para el secado de la pastilla por 30 min. El pellet fue resuspendido por inversión con 20 µl de Rehydratation Solution y 3 µl RNase. Se incubaron a 37°C por una hora. La mezcla que contiene el ADN se colocó a -20°C para su posterior uso.

3.2.3.2 Análisis de secuencias

La secuenciación de los productos amplificados se llevó a cabo con el método de Sanger en la empresa MacroGen (Korea). Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas con el programa (BioEdit) y comparadas con secuencias de referencia extraídas del banco de datos del centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI).

3.2.3.3 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico para las pruebas de antagonismo *in vitro* de hongos y actinomicetos contra *Colletotrichum* spp. Para ello se utilizó un modelo

experimental en bloques usando el paquete de análisis estadístico SAS® System for Windows V9, 2002.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.3.1 Aislamiento de antagonistas y ensayos antagónicos.

Se obtuvieron dieciséis bacterias, dos actinomicetos y once hongos del suelo los cuales se estudiaron en ensayos antagónicos *in vitro*. Con base en la técnica de cultivo dual, tres bacterias en proceso de identificación mostraron control en el crecimiento de *Colletotrichum* spp (Figura 15). El porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de las tres bacterias muestran efecto inhibitorio en algunos aislados de *Colletotrichum* spp. del 33.3% los cuales se muestran en los Gráficos 1, 2, 3.

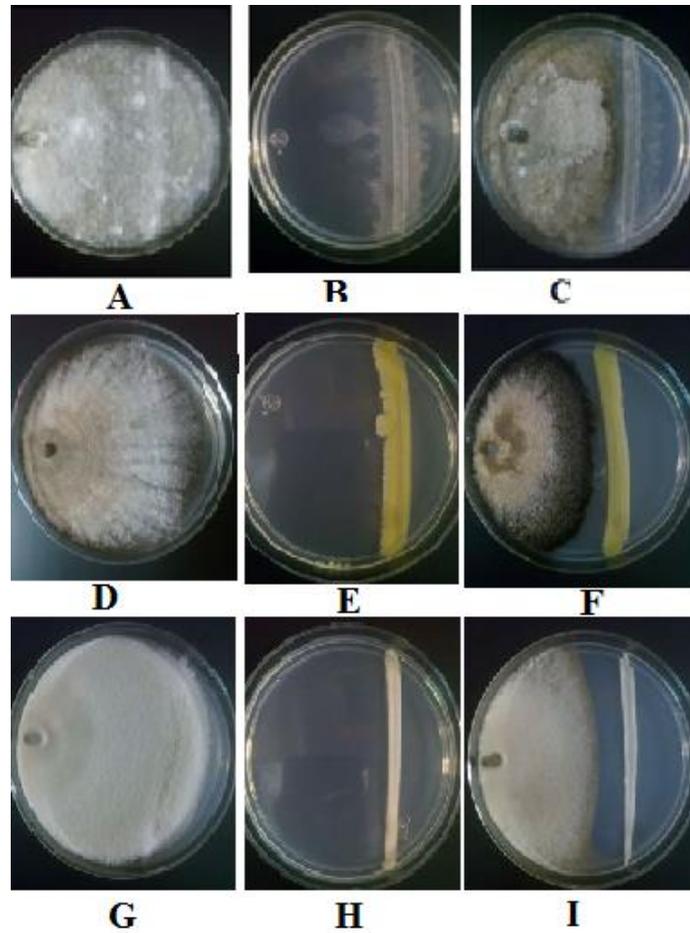


Figura 15. Ensayos de antagonismo con bacterias nativas contra *Colletotrichum* sp. Crecimiento de *Colletotrichum* sp. solo (A, D, G). Crecimiento de Bacteria sola (B, E, H), Cultivo dual, crecimiento de *Colletotrichum* sp. con una bacteria nativa (C, F, I).

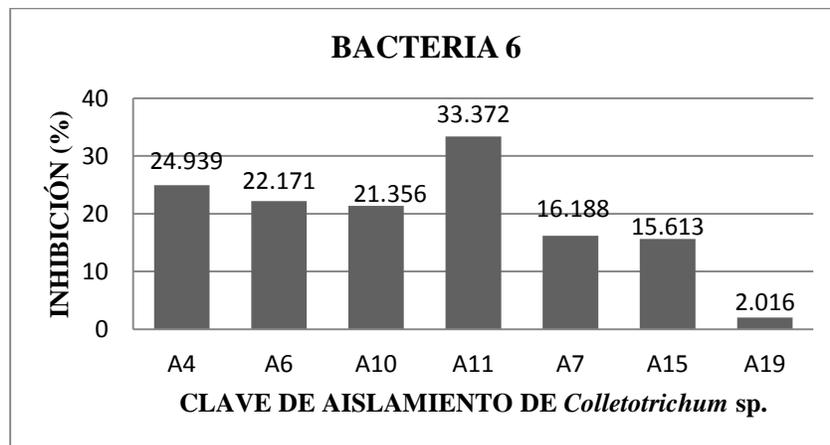


Gráfico 1. Porcentaje de inhibición de la bacteria 6 sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp.

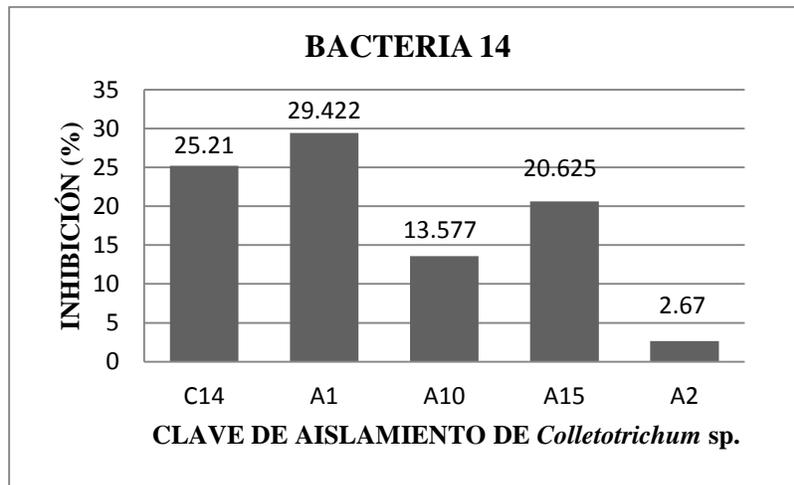


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición de la bacteria 14 sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp.

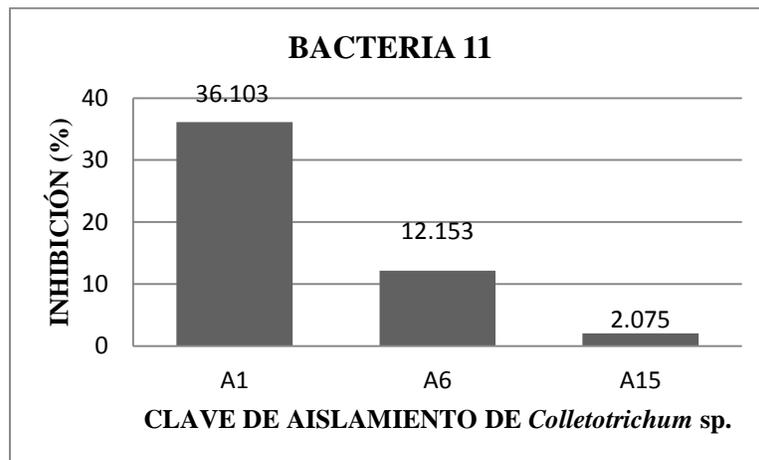


Gráfico 3. Porcentaje de inhibición de la bacteria 11 sobre el crecimiento micelial de *Colletotrichum* spp.

Cuatro hongos y dos actinomicetos aislados del suelo mostraron efectos inhibitorios sobre el patógeno *Colletotrichum* spp. Dávila *et al.* (2013) obtuvieron resultados favorables con aislamientos de actinomicetos que mostraron inhibición de 61.57% contra *Colletotrichum* (Figura 20 y 21). Asimismo, Li *et al.* (2017) mostró efectos inhibitorios significativos utilizando actinomicetos en pruebas de inhibición

en el cual todas las cepas exhibieron la capacidad de producir enzimas extracelulares para la degradación de la pared celular.

Algunas investigaciones han mostrado que cepas de *Penicillium* spp. (Figura 18 y 19) muestran actividad antifúngica contra fitopatógenos debido a la capacidad para producir enzimas como modo de acción. También se ha investigado la capacidad antagonista de *Aspergillus* spp (Figura 17). De acuerdo con Pérez *et al.* (2009), las especies *A. candidus* Link es antagonista de los hongos anamorfos *Stromatinia cepivora* (Berk.) Whetzel sin. *Sclerotium cepivorum* y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, y también biocontrolador de los insectos *Mahasena corbetti* y *Metisa plana*.

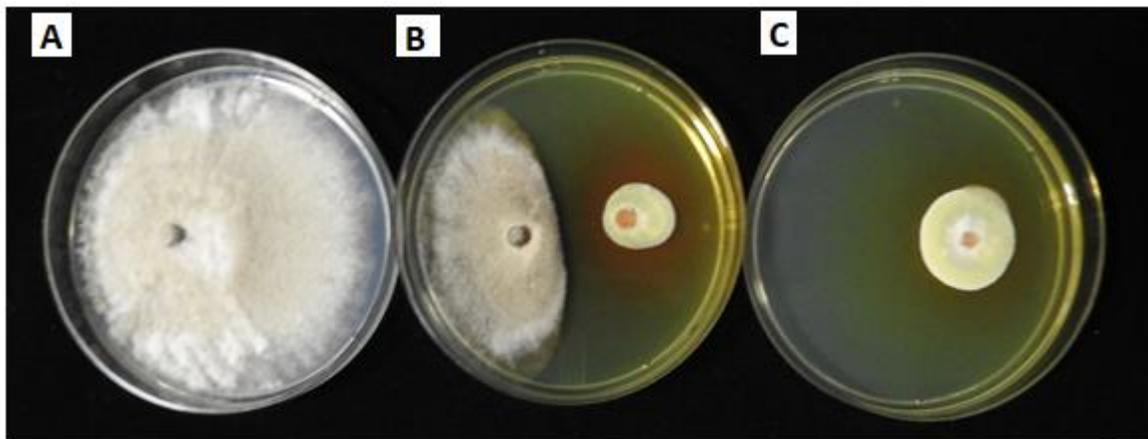


Figura 16. Prueba de antagonismo del aislamiento N1 contra el aislamiento de *Colletotrichum* sp. (A1). A. Crecimiento de *Colletotrichum* sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de *Colletotrichum* sp. con antagonista N1. C. Crecimiento de antagonista solo.

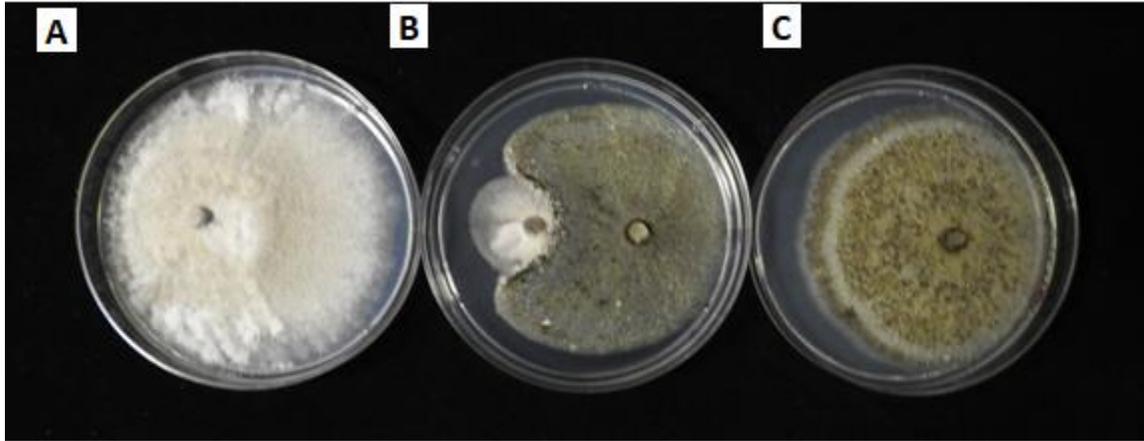


Figura 17. Prueba de antagonismo del aislamiento N3 contra el aislamiento de *Colletotrichum* sp. (A1). A. Crecimiento de *Colletotrichum* sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de *Colletotrichum* sp. con antagonista N3. C. Crecimiento de antagonista solo.

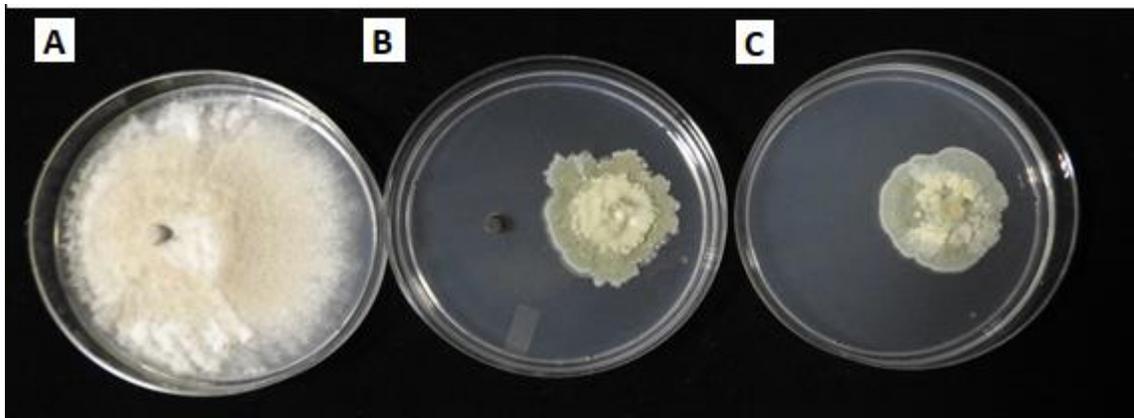


Figura 18. Prueba de antagonismo del aislamiento N5 contra el aislamiento de *Colletotrichum* sp. (A1). A. Crecimiento de *Colletotrichum* sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de *Colletotrichum* sp. con antagonista N5. C. Crecimiento de antagonista solo.

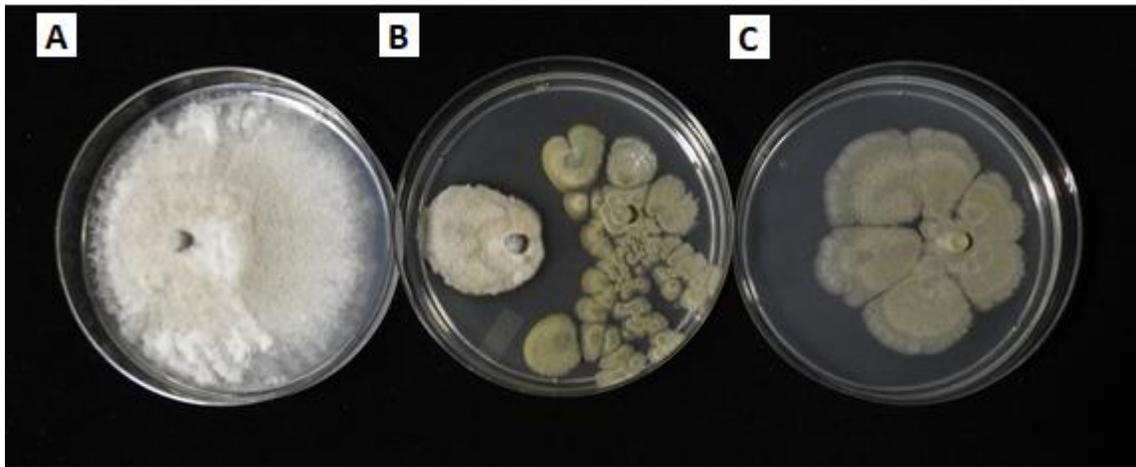


Figura 19. Prueba de antagonismo del aislamiento N6 contra el aislamiento de *Colletotrichum* sp. (A1). A. Crecimiento de *Colletotrichum* sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de *Colletotrichum* sp. con antagonista N6. C. Crecimiento de antagonista solo.

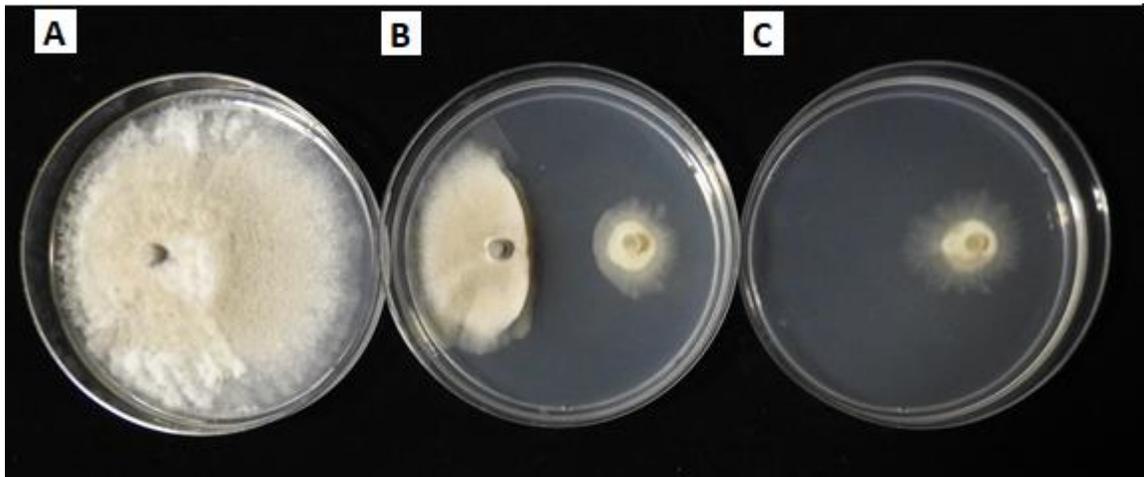


Figura 20. Prueba de antagonismo del aislamiento N7 contra el aislamiento de *Colletotrichum* sp. (A1). A. Crecimiento de *Colletotrichum* sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de *Colletotrichum* sp. con antagonista N7. C. Crecimiento de antagonista solo.

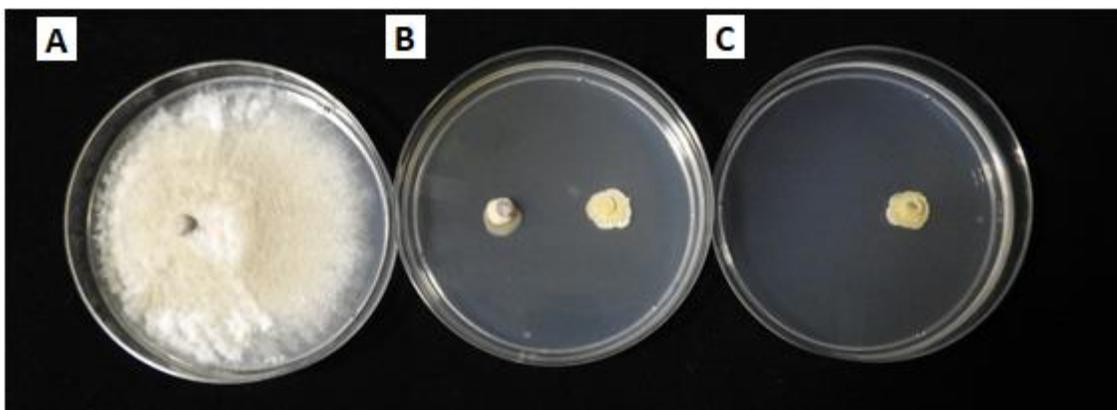


Figura 21. Prueba de antagonismo del aislamiento N13 contra el aislamiento de *Colletotrichum* sp. (A1). A. Crecimiento de *Colletotrichum* sp. solo. B. Cultivo dual, crecimiento de *Colletotrichum* sp. con antagonista N13. C. Crecimiento de antagonista solo.

3.3.2 Identificación molecular.

Los resultados obtenidos de la empresa Macrogen fueron alineados mediante el software Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) el cual mostró para la Bacteria 6 un 99% de identidad (valor de $E=0$) con *Bacillus thuringiensis* sin embargo no se obtuvieron resultados de hongos y actinomicetos.

De acuerdo con estudios de Morales *et al.* (2006) demostraron que *B. thuringiensis* produce la enzima quitinasa la cual muestra actividad lítica contra las paredes celulares de seis hongos fitopatógenos e inhibió el crecimiento micelial de ambos *Fusarium* sp. y *Sclerotium rolfsii*.

3.3.3 Capacidad antagónica contra *Colletotrichum* spp.

El análisis estadístico nos muestra que los microorganismos antagonistas que manifestaron mayor inhibición en el crecimiento micelial de los patógenos de *Colletotrichum* spp. son N13, N5, N6, N1, N3, N7 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comportamiento de hongos y actinomicetos en las pruebas de antagonismo contra *Colletotrichum* spp.

ANTAGONISTA	AGRUPAMIENTO TUKEY	MEDIA [mm]
Testigo	A	43.8608
N10	B	22.3942
N12	B	21.5221
N2	C	18.3989
N11	C	17.0729
N9	D	14.5625
N8	D	14.4996
N4	D E	12.8965
N7	F E	11.0947
N3	F	10.3285
N1	F G	9.4592
N6	F G	8.0629
N5	H G	7.3296
N13	H	5.8382

3.4 CONCLUSIONES

Los aislamientos de las bacterias nativas presentaron porcentajes bajos de inhibición (PICR < 35%) para todos los aislamientos de *Colletotrichum* spp, mientras que los hongos y actinomicetos mostraron un porcentaje de inhibición mayor al 50%, por lo cual es necesario conocer los mecanismos de acción y su identificación para sus posteriores estudios *in vivo*.

Hongos como *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp. muestran un grado de inhibición sin embargo, son considerados como hongos fitopatógenos, por lo que su uso en campo podría ser promisorio para el control a *Colletotrichum* spp.

La búsqueda de microorganismos del suelo con capacidad antagónica tiene como propósito contribuir al manejo integrado de enfermedades que prometen aplicaciones prácticas para el desarrollo de una agricultura orgánica y sustentable.

3.5 REFERENCIAS CITADAS

- Bar-Shimon M., Yehuda H., Cohen L., Weiss B., Kobeshnikoz A., Daus A., Goldway M., Wisniewski, M., & Droby S 2004. Characterization of extracelular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics* 45: 140-148.
- Carcaño-Montiel, M., Ferrera-Cerrato, R., Pérez-Moreno, J., Molina-Galán, J. y Bashan, Y. 2006. Actividad nitrogenasa en *Azospirillum* y *Kklebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana*. Vol. 24 (4).
- Carrillo-Fasio, J.A., García-Estrada, R.S., Muy-Rangel, M.D., Sañudo Barajas, A., Márquez-Zequera, I., Allende-Molar, R., de la Garza-Ruiz, Z., Patiño-Vera, M. y Galindo-Fentanes, E. 2005. Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:24-32.
- Dávila, M., Gallegos, G., Hernández, F.D., Ochoa, Y. M. y Flores, A. 2013. Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol. 4 (8): 1187-1196.
- Di Barbaro, G., González, V., y Batallán, S. 2014. *Trichoderma* sp. Y *Azospirillum* sp., potenciales agentes de biocontrol de fitopatógenos. Artículo de revisión. *Biología en agronomía* 4 (1): 177-189.
- Fernández-Larrea, O. (2001). Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica, 62, 96-100.

- Fernández, C. y Juncosa, R. 2002. Biopesticidas: ¿La agricultura del futuro?. *Phytoma* 141: 14-19.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu, A., Dag, A., Shafir, S. & Elad, Y. (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. Kluwer Academic Publishers. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 361–370.
- Huang JW, Kuhlman EG. 1991. Formulation of a soil amendment to control dampingoff of slash pine seedlings. *Phytopathology* 81: 163-170.
- Li, Y., He., F., Lai, H. y Xue, Q. 2017. Mechanism of in vitro antagonism of phytopathogenic *Scelrotium rolfsii* by actinomycetes. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2), 299-311.
- Ikotun T. 1984. Cell wall-degrading enzymes produced by *Penicillium oxalicum*. Currie and Thom. *Mycopathologia* 88: 15-21.
- Mochizuki, M., Yamamoto, S., Aoki, Y., & Suzuki, S. (2012). Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol Science and Technology*, 22(6), 697-709.
- Morales, L., Barboza-Corona, E., Aguilar-Uscanga, M. y Ramírez-Lepe, M. 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. Aizawai and its action against phytopathogenic fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(7): 651-657.
- Ownley B, Benson DM. 1987. Biological control of *Phytophthora* root rot of azalea with *Penicillium oxalicum*. *Phytopathology* 77: 1688.

- Pal, K. & MacSpadden, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 10, 1-25.
- Pandey PR, Arora DK, Dubey RC. 1993. Antagonistic interactions between fungal pathogen and phylloplane fungi of guava. *Mycopathologia* 124: 31-39.
- Pérez Bocourt, Y., Cantillo Pérez, T., Ramos Ramos, E., González García, M., & López Mesa, M. O. (2009). Prospección de hongos de suelo con potencialidades para el control biológico en suelos de agroecosistemas cubanos. *Fitosanidad*, 13(1), 3-5.
- Pérez-Leblic MI, Reyes F, Lahoz R. 1982. Autolysis of *Penicillium oxalicum* with special reference to its cell walls. *Can J Microbiol* 28: 1289-1295.
- Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G., Miranda-Salcedo, M. y Peña Cabriales, J. 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2615–2623.
- Tortora, M., Díaz-Ricci, J. & Pedraza, R. (2011). *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of microbiology*, 193(4), 275-286.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T. & Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 62 (3), 611-623.
- Windels CE, Kommedahl T. 1978. Factors affecting *Penicillium oxalicum* as a seed protectant against seedling blight of pea. *Phytopathology* 68: 1656-1661.

