



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA  
AGRÍCOLA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN  
PROTECCIÓN VEGETAL**

**“SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *Colletotrichum acutatum*  
Simmonds A FUNGICIDAS BENZIMIDAZOLES Y  
ESTROBIRULINAS, AISLADAS DEL CULTIVO DE FRESA EN  
MICOACÁN, MÉX.”**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ESPINOZA ALTAMIRANO DAVID**

**CHAPINGO, MÉXICO, JUNIO DE 2010**



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA  
OFICINA DE REGISTRO Y CONTROL

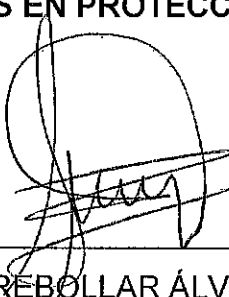


**"SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *Colletotrichum acutatum* Simmonds A  
FUNGICIDAS BENCIMIDAZOLES Y ESTROBIRULINAS, AISLADAS DEL  
CULTIVO DE FRESA EN MICHOACÁN, MÉX."**

Tesis realizada por **Espinoza Altamirano David** bajo la dirección del Comité  
Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para  
obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

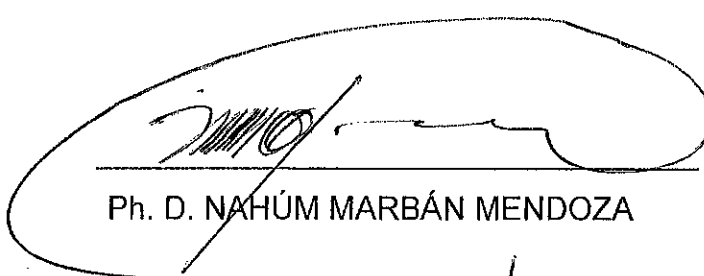
DIRECTOR:



---

Ph.D. ÁNGEL REBOLLAR ÁLVITER

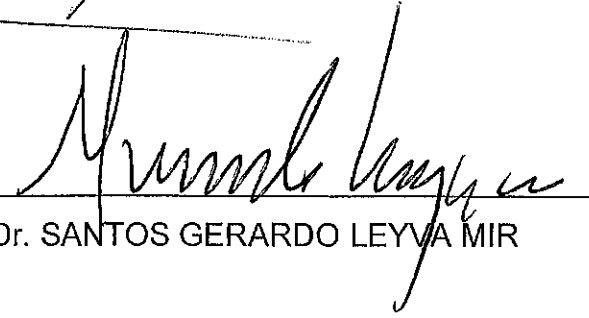
ASESOR:



---

Ph. D. NAHÚM MARBÁN MENDOZA

ASESOR:



---

Dr. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

CHAPINGO, MÉXICO, JUNIO DE 2010

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para la realización de los Estudios de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal.

A la Universidad Autónoma Chapingo, el Departamento de Parasitología Agrícola y toda la comunidad que los conforman por haber permitido una etapa más en mi formación profesional y humana.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el financiamiento brindado para la realización de la presente Tesis.

Al PhD. Ángel Rebollar Álviter por su valiosa ayuda en el desarrollo del presente trabajo de investigación y en especial por su apropiado, amigable y desprendido asesoramiento académico y humano, así como por todo el tiempo y recursos brindados.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por su meritoria y fundamental colaboración académica en el desarrollo de la presente tesis, así como su apreciable amistad brindada.

A la MC Bertha Tlapal Bolaños, por su gran apoyo académico, moral y material en el desarrollo del presente trabajo. En especial por la confianza y cordialidad mostrada.

A los Doctores Nahúm Marbán Mendoza y Gerardo Leyva Mir por su valioso apoyo, aportaciones y sugerencias en la realización del presente trabajo.

Al personal del Centro Regional Universitario Centro Occidente (CRUCO) por las facilidades brindadas durante la realización de este trabajo.

A todos los compañeros, amigos y familiares que aportaron momentos fundamentales para el vivir diario en esta etapa de mi formación.

## DATOS BIOGRÁFICOS

**David Espinoza Altamirano**, nació el 26 de julio de 1983 en la delegación Iztapalapa, D.F., siendo el cuarto hijo y el menor de sus hermanos. Descendiente de padres mexicanos, originarios de generaciones del municipio de San Salvador Atenco, Edo. de México, lugar donde vivió su niñez y realizó su educación básica.

En el año de 1998 ingresó a la Preparatoria Agrícola adscrita a la Universidad Autónoma Chapingo con una duración de tres años de estudio. En julio de 2001, ingresó al Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo en Texcoco, Edo. De México, egresando de ésta en el año 2005 y después de sustentar el examen profesional y presentar el trabajo de tesis intitulado "ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL DE DOS ESPECIES DE PULGONES Y MOSCA BLANCA EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) EN MIXQUIC, TLAHUAC, D.F.", recibió el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Parasitología Agrícola.

A partir de noviembre de 2005 y hasta el mes de julio de 2007 prestó sus servicios profesionales en la empresa "Naturalmente Puresa S.A. de C.V." y en el mes de agosto del mismo año ingresó al programa de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal del Dpto. de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, de la cual egresó en julio de 2009 y desarrolló el presente trabajo de investigación bajo el título "SENSIBILIDAD DE *Colletotrichum acutatum* Simmonds A FUNGICIDAS BENCIMIDAZOLES Y ESTROBIRULINAS, AISLADAS DEL CULTIVO DE FRESA EN MICHOACAN, MÉX."

## INDICE GENERAL

|                                                                                   | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------|
| INDICE DE CUADROS.....                                                            | i    |
| INDICE DE FIGURAS.....                                                            | ii   |
| RESUMEN.....                                                                      | iv   |
| ABSTRACT.....                                                                     | v    |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                                              | 1    |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                 | 3    |
| 3. REVISIÓN DE LITERATURA.....                                                    | 4    |
| 3.1. El cultivo de fresa ( <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.).....                 | 4    |
| 3.1.1. Generalidades.....                                                         | 4    |
| 3.1.2. Variedades.....                                                            | 6    |
| 3.1.3. Importancia mundial y nacional.....                                        | 9    |
| 3.2. Antracnosis de la fresa <i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds.....         | 12   |
| 3.2.1. Importancia.....                                                           | 12   |
| 3.2.2. Origen y distribución.....                                                 | 14   |
| 3.2.3. Agente causal.....                                                         | 16   |
| 3.2.3.1. Taxonomía.....                                                           | 16   |
| 3.2.3.2. Morfología.....                                                          | 17   |
| 3.2.3.3. Identificación y diagnóstico con técnicas moleculares.....               | 19   |
| 3.2.4. Sintomatología.....                                                        | 21   |
| 3.2.5. Ciclo biológico de la enfermedad.....                                      | 23   |
| 3.2.6. Interacción planta-patógeno.....                                           | 26   |
| 3.2.7. Manejo de la enfermedad.....                                               | 27   |
| 3.3. Fungicidas.....                                                              | 30   |
| 3.3.1. Bencimidazoles.....                                                        | 31   |
| 3.3.2. Inhibidores externos de la quinona (Qol) o estrobirulinas.....             | 32   |
| 3.4. Estudios de sensibilidad de <i>Colletotrichum</i> a fungicidas.....          | 33   |
| 3.5. Generalidades sobre resistencia a fungicidas.....                            | 38   |
| 3.6. Sensibilidad y resistencia de <i>Colletotrichum</i> a fungicidas en México.. | 40   |

|                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7. Estudios de sensibilidad a fungicidas.....                                                                                                  | 41        |
| 3.7.1. Ensayos de sensibilidad <i>in vitro</i> .....                                                                                             | 42        |
| 3.7.2. Evaluación de los ensayos de sensibilidad <i>in vitro</i> .....                                                                           | 43        |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                                                                                                              | <b>45</b> |
| 4.1. Localización del sitio experimental.....                                                                                                    | 45        |
| 4.2. Identificación morfológica y molecular de aislamientos.....                                                                                 | 45        |
| 4.2.1. Colecta de material vegetal en campo.....                                                                                                 | 46        |
| 4.2.2. Manejo de muestras para obtención de cepas monospóricas.....                                                                              | 48        |
| 4.2.3. Extracción y amplificación de DNA del hongo.....                                                                                          | 49        |
| 4.2.3.1. Extracción de DNA por método rápido.....                                                                                                | 50        |
| 4.2.3.2. Extracción de DNA método de Sambrook (1986) y Bainbridge <i>et al</i> , 1990 modificado por Cámara (2001), para bacterias y hongos..... | 50        |
| 4.2.4. Manejo de secuencias de DNA.....                                                                                                          | 50        |
| 4.2.5. Identificación morfológica de aislamientos.....                                                                                           | 50        |
| 4.3. Determinación de la sensibilidad a fungicidas.....                                                                                          | 51        |
| 4.3.1. Fungicidas.....                                                                                                                           | 52        |
| 4.3.2. Preparación de soluciones madre y medio de cultivo adicionado...                                                                          | 52        |
| 4.3.3. Ensayo de crecimiento micelial.....                                                                                                       | 53        |
| 4.3.4. Ensayo de germinación de conidios.....                                                                                                    | 54        |
| 4.3.5. Análisis de datos.....                                                                                                                    | 56        |
| 4.3.5.1. Estimación de concentraciones efectivas 50 (CE <sub>50</sub> ).....                                                                     | 56        |
| 4.3.5.2. Distribución de la sensibilidad.....                                                                                                    | 57        |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>                                                                                                            | <b>58</b> |
| 5.1. Identificación morfológica de aislamientos.....                                                                                             | 58        |
| 5.2. Identificación molecular de aislamientos.....                                                                                               | 59        |
| 5.3. Ajuste del modelo estadístico.....                                                                                                          | 62        |
| 5.4. Distribución de la sensibilidad de cepas de <i>Colletotrichum acutatum</i> al tiofanato metil.....                                          | 63        |
| 5.4.3. Relación de la sensibilidad de conidios y micelio al tiofanato metílico.....                                                              | 68        |
| 5.5. Distribución de la sensibilidad de cepas de <i>Colletotrichum acutatum</i>                                                                  |           |

|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| al azoxystrobin.....                                                        | 68        |
| 5.5.3. Relación de la sensibilidad de conidios y micelio al azoxystrobin... | 71        |
| <b>6. CONCLUSIONES.....</b>                                                 | <b>74</b> |
| <b>7. LITERATURA CITADA.....</b>                                            | <b>76</b> |
| <b>8. ANEXO 1.....</b>                                                      | <b>83</b> |
| <b>9. ANEXO 2.....</b>                                                      | <b>86</b> |

## INDICE DE CUADROS

|                                                                                                                                                                                                                                           | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Cuadro 1.</b> Porcentaje de producción, valor, rendimiento y superficie sembrada de fresa por entidad federativa en 2008.....                                                                                                          | 10   |
| <b>Cuadro 2.</b> Superficie, cantidad y rendimientos por municipio de productores de fresa en Michoacán en el año 2008.....                                                                                                               | 11   |
| <b>Cuadro 3.</b> Aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> obtenidos, cultivar, estructura y origen de colecta.....                                                                                                                  | 46   |
| <b>Cuadro 4.</b> Homologías obtenidas entre secuencias amplificadas y accesiones depositadas en GenBank del NCBI mediante BLAST.....                                                                                                      | 60   |
| <b>Cuadro 5.</b> Estadística básica y momentos de los valores de DE <sub>50</sub> (µg/ml) en micelio y conidios de <i>C. acutatum</i> obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora para el fungicida tiofanato metil, 2009..... | 64   |
| <b>Cuadro 6.</b> Estadística básica y momentos de los valores de CE <sub>50</sub> (µg/ml) en micelio y conidios de <i>C. acutatum</i> obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora para el fungicida azoxystrobin, 2009.....    | 69   |

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                      | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figura 1.</b> Planta típica de fresa en producción.....                                                                                                                           | 5    |
| <b>Figura 2.</b> Colonia típica de <i>Colletotrichum acutatum</i> en medio de cultivo PDA.....                                                                                       | 18   |
| <b>Figura 3.</b> Morfología típica de conidios maduros de <i>Colletotrichum acutatum</i> .....                                                                                       | 19   |
| <b>Figura 4.</b> Lesión característica de antracnosis en frutos de fresa.....                                                                                                        | 22   |
| <b>Figura 5.</b> Colecta de frutos con lesiones típicas de antracnosis.....                                                                                                          | 46   |
| <b>Figura 6.</b> A. Selección de conidios individuales germinados, B. Crecimiento de cultivos monospóricos en medio nutritivo PDA.....                                               | 49   |
| <b>Figura 7.</b> Solución madre y medio nutritivo adicionado con fungicida.....                                                                                                      | 53   |
| <b>Figura 8.</b> Medición del diámetro de colonia.....                                                                                                                               | 54   |
| <b>Figura 9.</b> Conidio germinado con tubo germinativo proyectado normalmente.....                                                                                                  | 56   |
| <b>Figura 10.</b> Morfología típica de conidios de <i>Colletotrichum acutatum</i> .                                                                                                  | 58   |
| <b>Figura 11.</b> Electroforesis de producto de la amplificación por PCR de la región ITS 4 e ITS 5 del DNA ribosomal.....                                                           | 59   |
| <b>Figura 12.</b> Curva respuesta típica de valores para la dosis efectiva predicha en aislamientos de <i>Colletotrichum acutatum</i> expuestos a azoxystrobin <i>in vitro</i> ..... | 63   |
| <b>Figura 13.</b> Distribución de la sensibilidad de cepas de <i>C. acutatum</i> a tiofanato metílico en estado de micelio.....                                                      | 66   |
| <b>Figura 14.</b> Distribución de la sensibilidad de cepas de <i>C. acutatum</i> a tiofanato metílico en estado de conidios.....                                                     | 67   |

|                   |                                                                                                                                                                      |    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 15.</b> | Distribución de la sensibilidad de cepas de <i>C. acutatum</i> a azoxystrobin en etapa de micelio.....                                                               | 70 |
| <b>Figura 16.</b> | Distribución de la sensibilidad de cepas de <i>C. acutatum</i> a azoxystrobin en etapa de conidios.....                                                              | 71 |
| <b>Figura 17.</b> | Inhibición del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i> , en medio de cultivo PDA con diferentes concentraciones de azoxystrobin.....                  | 86 |
| <b>Figura 18.</b> | Inhibición de la germinación de conidios de <i>Colletotrichum acutatum</i> , en medio de cultivo Agua-Agar con diferentes concentraciones de tiofanato metílico..... | 87 |

**“SENSIBILIDAD DE CEPAS DE *Colletotrichum acutatum* Simmonds A FUNGICIDAS BENCIMIDAZOLES Y ESTROBIRULINAS, AISLADAS DEL CULTIVO DE FRESA EN MICHOACAN, MÉX.”**

**RESUMEN**

*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds afecta a un amplio rango de cultivos alrededor del mundo, produciendo síntomas típicos de antracnosis y es una de las enfermedades fungosas más importantes en fresa. Se determinó la sensibilidad de *Colletotrichum acutatum*, aislado de plantas de fresa, a fungicidas bencimidazoles (tiofanato metílico) y estrobirulinas (azoxystrobin), basada en el crecimiento de micelio y germinación de conidios. Se evaluaron 60 aislamientos monospóricos de dos regiones del Estado de Michoacán. La dosis efectiva que redujo en un 50% el crecimiento de micelio ( $DE_{50}$ ) con tiofanato metílico varió de 0.28 a 9.72  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Maravatío y de 1.39 a 2.9  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Zamora. En etapa de conidio la distribución de  $DE_{50}$  para tiofanato metílico fue más dispersa, varió entre 0.9 a 396.4  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Maravatío y de 0.43 a 63.32  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Zamora. La sensibilidad de las cepas de *C. acutatum* al azoxystrobin, en etapa de micelio, varió entre una  $DE_{50}$  de 0.04 a 0.36  $\mu\text{g/ml}$  en Maravatío y de 0.07 a 0.99  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Zamora. La distribución de la sensibilidad en etapa de conidios, estuvo entre 0.01 a 0.56  $\mu\text{g/ml}$  para el Valle de Maravatío y 0.006 a 0.15  $\mu\text{g/ml}$  para el Valle de Zamora con el mismo fungicida. El análisis de correlación de Pearson, mostró que tanto en Maravatío ( $r=0.11$ ;  $P=0.31$ ) como en Zamora ( $r= 0.118$ ;  $P= 0.403$ ) no existen una correlación significativa entre la sensibilidad que guardan ambas estructuras fungosas para los dos fungicidas.

**Palabras clave:** *Colletotrichum acutatum*, sensibilidad, bencimidazoles, estrobirulinas.

**"SENSITIVITY OF *Colletotrichum acutatum* Simmonds TO  
BENZIMIDAZOLE AND STROBIRULIN FUNGICIDES, ISOLATED FROM  
STRAWBERRY IN MICHOACAN MEXICO"**

**ABSTRACT**

*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds affects a wide range of crops worldwide, causing Anthracnose and it is one of the major fungal diseases in strawberry. Sensibility of *Colletotrichum acutatum*, isolated from strawberry plants growing in Michoacan state to bencimidazole fungicides (thiophanate-methyl) and Qol's ( azoxystrobin, were determinated based in micelia growth and conidia germination. Sixty monosporic isolates strawberry regions were evaluated. The effective dose that reduced growth by 50% (ED<sub>50</sub> values) of micelio's growth with thiophanate-methyl ranged from 0.28 to 9.72 µg/mL in Maravatio's valley and 1.39 to 2.99µg/mL in Zamora's valley, respectively. In conidio's stage the distribution of ED<sub>50</sub> for thiophanate-methyl was more dispersed, the values ranged from 0.9 to 396.4µ/mL in Maravatio's Valley and from 0.43 to 63.32µg/mL in Zamora's valley. The ED<sub>50</sub> values of *C acutatum* isolates to azoxystrobin, in the stage of micelio, was in Zamora's valley from 0.04 to 0.99µg/mL while in 0.36 to 0.07µg/mL. The ED<sub>50</sub> values for conidia to azoxystrobin fungicide ranged from 0.01 to 0.56µg/mL in Maravatio's valley and 0.006 to 0.15µg/mL for Zamora's valley. The correlation analysis of Pearson showed that in Maravatio ( $r= 0.11$ ;  $P= 0.31$ ) like in Zamora ( $r= 0.118$ ;  $P= 0.403$ ) do not exist a significant correlation in the sensibility in both fungous structures to fungicides.

Key Words: *Colletotrichum acutatum*, sensibility, bencimidazoles, estrobirulinas.

## 1. INTRODUCCIÓN

La fresa es uno de los frutos altamente apreciados en el mundo por su sabor y por su riqueza en vitaminas y minerales; además es un producto que tiene una amplia posibilidad de utilización industrial en la obtención de diferentes productos como mermeladas, purés, concentrados, helados, saborizantes, etc.

La fresa de nuestro país que presenta características de calidad y por complementar la demanda del mercado norteamericano, lo convierte en un producto de exportación. Así mismo por la distinta infraestructura y nivel tecnológico para la producción, las regiones que producen fresa en nuestro país, se especializan en el mercado ya sea nacional o internacional.

Los principales países productores de fresa en el mundo en 2009 fueron Estados Unidos de Norteamérica, España, Turquía, Fed. Rusa, Corea, Japón y México en séptimo lugar. El principal exportador de fresa a nivel mundial en 2007 fue España con un monto de 186,377 toneladas, Estados Unidos es el segundo exportador y México ocupa el tercer lugar con 66,914ton y un valor aproximado de 1,859 U.S.DLL/ton. Francia, Canadá y Alemania fueron los países que más importaron fresa en el mundo en el año 2007 y México ocupó el 10° sitio. En cuanto al rendimiento promedio nacional, se registraron 28.27ton/ha y se cosechó una superficie de 6,238has en 2009 (FAO, 2009)<sup>1</sup>.

Como factor limitante en la producción, la antracnosis de la fresa se ha reportado como una de las enfermedades más importantes del cultivo, siendo una enfermedad habitualmente de los frutos, observada como una pudrición, pero también se presenta sobre estolones, hojas, pecíolos y coronas. Se han reportado tres especies de *Colletotrichum* afectando el cultivo, siendo *C. gloesporioides* y *C. fragariae* descritas como menos comunes y *C. acutatum* como la especie principal que causa la antracnosis en fruto (MacKenzie y

---

<sup>1</sup> FAO, 2009. Página de estadísticas agrícolas y alimentarias. FAOSTAT. En línea: <http://faostat.fao.org>.

Peres, 2007). Las lesiones provocadas son muy similares en las tres especies y el teleomorfo reportado es *Glomerella cingulata* (Freeman y Katan, 1997).

Las numerosas especies de *Colletotrichum* descritas en hospedante específicos, pueden considerarse virtualmente como formas especiales de *Glomerella cingulata*, ya que apenas se diferencian morfológicamente de *C. gloesporioides*, sin embargo son entidades ciertamente distintas (Smith *et al*, 1992). Tradicionalmente muchos aislamientos de *C. acutatum* se han identificado como *C. gloesporioides*, pero el uso de herramientas moleculares han permitido la separación de especies (Wharton y Diéguez, 2004).

En cuanto al manejo se refiere, el uso de moléculas sintéticas o control químico, sigue siendo ampliamente usado debido a su fácil implementación, su poca demanda de mano de obra y al resultado de impacto que presenta, además de que existe una gama importante de productos que tienen efectos en contra del agente causal de la enfermedad, sin embargo, por la alta dependencia de estas herramientas el problema de la tolerancia a fungicidas puede aparecer rápidamente, además de que existen otras limitantes en el uso de estas moléculas sintéticas (Wharton y Diéguez, 2004).

La necesidad realizar la presente investigación se basa en el hecho de que en México no hay antecedentes de estudios similares. No se ha determinado la sensibilidad que guarda *Colletotrichum acutatum*, ni otros agentes causales de la antracnosis en fresa, a alguno de los fungicidas con los que normalmente se controla. Por lo tanto los resultados de esta investigación permitirán conocer el grado de sensibilidad del patógeno hacia fungicidas y esto tendrá una gran aplicación práctica en el manejo de la enfermedad. Así mismo el empleo de herramientas moleculares en el diagnóstico e identificación del patógeno, permitirá conocer con precisión el agente causal y con ello encaminar de forma correcta y eficiente los métodos de control de esta enfermedad.

## 2. OBJETIVOS

- Determinar la distribución de sensibilidad de *Colletotrichum acutatum* aislados de frutos, hojas y/o estolones de fresa en dos zonas productoras del Estado de Michoacán a un fungicida del grupo estrobirulinas o inhibidores externos de la quinona (QoI's) y un fungicida de los bencimidazoles.
- Comparar la distribución de la sensibilidad de *C. acutatum* a los fungicidas mencionados en aislamientos provenientes de dos zonas contrastantes tecnológicamente en la producción de fresa.
- Identificar morfológica y molecularmente la especie o especies del género *Colletotrichum*, aisladas de frutos y partes vegetativas del cultivo de fresa, provenientes de dos zonas productoras del Estado de Michoacán.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. El cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.)

##### 3.1.1. Generalidades

La fresa (*Fragaria* spp.) es una planta de porte bajo y tallos rastreros que agrupa varias especies de plantas, que se relacionan por la fragancia que poseen (*fraga*, en latín) las cuales son cultivadas por su fruto comestible. Las variedades cultivadas comercialmente son híbridos, en especial *Fragaria x ananassa*, la cual ha reemplazado casi universalmente a la especie silvestre, *Fragaria vesca*, por el tamaño superior de frutos (Darrow, 1966; Jackson y Looney, 1999).

La posición taxonómica de la fresa de acuerdo a Darrow (1966) es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Subfamilia: Rosoideae

Género: *Fragaria*

Es una planta perenne que produce brotes nuevos cada año. Presenta una roseta basal de donde surgen las hojas y los tallos florales, ambos de la misma longitud. Los tallos florales no presentan hojas. En su extremo aparecen las flores con cinco pétalos blancos, cinco sépalos y numerosos estambres. Los pecíolos de las hojas son pilosos. Cada uno soporta una hoja compuesta con tres folíolos ovales dentados como se observa en la Figura 1. Estos son verde brillante por el haz, más pálidos por el envés, que presenta una nervadura muy

destacada y una gran pilosidad. De la roseta basal surgen también otro tipo de tallos rastreros que producen raíces adventicias de donde nacen otras plantas (Darrow, 1966; López, 2008).



**Figura 1.** Planta típica de fresa en producción.

El fruto de la fresa es un eterio típico lleno de aquenios. Lo que se consume de esta planta es un eterio de color rojo, dulce aromático, un engrosamiento del receptáculo floral cuya función es contener dentro de sí los frutos verdaderos de la planta, pequeños aquenios de color oscuro que se alojan en cada eterio en un número de entre 150 y 200 (Darrow, 1966). El fruto de la fresa pertenece a la categoría de los no climatéricos y ello será importante en la estrategia de la cosecha (el fruto no completará su madurez comercial una vez recolectado). La forma y el tamaño de los frutos es una característica varietal, aunque se ven influenciadas por la posición en la inflorescencia y otros factores ambientales (López, 2008).

Debido a que la fresa es excelente fuente de vitamina C y B, así como de beta caroteno (vitamina A proveniente del reino vegetal) se considera que protege al

organismo contra el cáncer (contiene un ácido que neutraliza los efectos cancerígenos del humo del tabaco), gota (disminuye el ácido úrico), artritis y anemia. Es recomendable para el tratamiento de personas con hipertensión, mientras que la medicina natural la utiliza ampliamente para limpiar y purificar el aparato digestivo. Asimismo, desempeña una función importante en la síntesis del colágeno, proteína que de manera natural se encuentra en el cuerpo humano, encargada de proporcionar fuerza a huesos, piel, cabello, uñas y dientes (CONAFRESA, 2008)<sup>2</sup>.

### **3.1.2. Variedades**

Dentro de las variedades que se cultivan en México, y conforme lo reporta el CONAFRESA (2008)<sup>3</sup>, se tienen a las siguientes:

**FESTIVAL:** Actualmente esta es una de las variedades líderes en las regiones productoras de los estados de Guanajuato, Michoacán y Estado de México. Produce fruta abundante y de excelente calidad, tanto para consumo en fresco como para la industria. Generada en la Universidad de Florida, USA.

**SWEET CHARLIE:** Variedad de fruta grande, muy usada en el estado de Guanajuato, pero no se usa en Michoacán porque se menciona que es de consistencia blanda (aguada), muy susceptible al manejo. Generada en la Universidad de Florida, USA.

**GALEXIA:** Variedad nueva que recientemente se importó y está siendo probada en campo por los productores, por ahora no tiene demanda. Generada en la Universidad de Florida, USA.

---

<sup>2</sup> CONAFRESA (Consejo Nacional de la Fresa, A.C). 2008. Plan Rector Nacional Convergente. Sistema Producto Fresa en línea: <http://conafresa.com/index.php>.

<sup>3</sup> CONAFRESA (Consejo Nacional de la Fresa, A.C). 2008. Variedades de fresa utilizadas en México. Sistema Producto Fresa en línea: <http://conafresa.com/index.php>.

CAMINO REAL: Los productores de fresa en México la consideran de buena calidad, como variedad tardía (comienza a producir a mediados de noviembre), se describe como planta de porte pequeño y erecto lo que permite grandes densidades de plantación por hectárea y bajo buen manejo produce buen volumen de fruta. Se menciona que es de buen tamaño, firmeza y calidad de fruta y se le atribuye tolerancia a condiciones climáticas, plagas y enfermedades como la pudrición por *Verticillium*, *Phytophthora* y antracnosis. Generada en la Universidad de California, USA.

ALBION: Esta es la segunda variedad en importancia de la Universidad de California, es precoz y los productores la catalogan como muy buena. Esta variedad es de reciente introducción a México, ya que se conoció apenas en el 2006 y tiene una demanda ascendente. Su fruta es de muy buena calidad tanto para exportación como para el mercado nacional. Generada en la Universidad de California, USA.

CAMAROSA: Ha sido una de las variedades que se ha aprovechado por aproximadamente 10 años, aunque en la actualidad su demanda va en descenso, ante la entrada de nuevos y mejores materiales. Sus proveedores, la describen como variedad de día corto, con excepcional adaptación climatológica y que su fruto es de extraordinaria calidad y sabor también mencionan que el 60% de la producción mundial corresponde a esta variedad. Generada en la Universidad de California, USA.

AROMAS: Esta es una variedad precoz y es otra de las que ya han sido usadas en el pasado, pero su aceptación va en descenso. Los productores mencionan que es una variedad muy susceptible a las deformaciones, por lo que está siendo rechazada por el mercado. Generada en la Universidad de California, USA.

VENTANA: Existe información de que esta variedad tiene muy buena aceptación para su cultivo en Baja California por su precocidad y que en esa entidad se usa en mayor proporción que el resto de variedades; se menciona que no se ha adaptado muy bien a las condiciones de los estados productores del centro del país, particularmente en Michoacán, sin embargo algunos productores mencionan que en condiciones muy locales, les está dando buenos resultados, como es el caso en la Saucedá, municipio de Zamora, Mich. La producción de estolones de esta variedad es muy reducida, por lo que produce poca planta, sin embargo las plantas que produce son muy vigorosas y buenas productoras de fresa. De igual manera que en Baja California, esta variedad se comporta de manera precoz en el estado de Michoacán.

En materia fitosanitaria, esta variedad, es más susceptible que otras variedades a enfermedades fungosas, no obstante, reacciona muy favorablemente a la aplicación de fungicidas, por lo que muestra mucha facilidad para recuperarse del estrés por las enfermedades, manifestándose una excelente floración y excelente calidad de fruta. En lo referente a las plagas, manifiesta una marcada tendencia a la resistencia por ataque de plagas, particularmente lo relativo a los ácaros. La fruta, aunque es de muy buena calidad, es muy susceptible a su manejo; sin embargo tiene un buen peso, lo que permite un mayor rendimiento por hectárea. Generada en la Universidad de California, USA.

DIAMANTE: Refieren los productores que esta variedad se importó pero no funcionó bien, pero que suele comportarse muy rendidora bajo condiciones de invernadero en el estado de Jalisco. Generada en la Universidad de California, USA.

### 3.1.3. Importancia mundial y nacional

De acuerdo a los volúmenes de la producción mundial de fresa alcanzados en el periodo 2000-2007, información publicada por la FAO (2009)<sup>4</sup>, el mayor productor de fresa a nivel mundial es Estados Unidos de América, seguido por España y en tercer lugar participa la Ex Unión Soviética. Cabe destacar que los Estados Unidos de América participa con el 27.6% en relación al total de la producción mundial y supera al segundo país (España) con poco más del triple del volumen reportado. En el caso particular de México, éste se ubica como el noveno lugar con relación al volumen mundial.

Muestra de ello es que la mayor parte de la producción de la región del Valle de Zamora y la de Baja California, se destina a la exportación en fresco o congelada, ahora en lo que se refiere a la región de Irapuato y el resto de las zonas productoras de Michoacán se destinan al consumo nacional (SIAP-SAGARPA, 2009)<sup>5</sup>.

En lo que respecta a la producción de las Entidades Federativas que participan en mayor proporción en el volumen total nacional y de acuerdo al Cuadro 1, se observa que el estado de Michoacán participa con el 42.5 % de la producción, seguido por el estado de Baja California que aportó el 39.3 % de la producción y que muestra los mayores rendimientos en fresa, con 51.96 Ton/ha, después tenemos al estado de Guanajuato con el 9.5 % y por último el estado de México con el 2.5 % de la producción.

Es muy importante mencionar que el periodo de cosecha de la fresa en México, varía de una entidad a otra así, tenemos que el estado de Baja California y

---

<sup>4</sup> FAO, 2009. Página de estadísticas agrícolas y alimentarias. FAOSTAT. En línea: <http://faostat.fao.org/site/567>.

<sup>5</sup> SIAP- SAGARPA. 2009. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación en línea: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>

Guanajuato, cosecha a partir del mes de enero; Guanajuato concluye en julio y Baja California en agosto. Michoacán y el Estado de México tienen el mismo periodo de cosecha, entre los meses de noviembre a junio. Sin embargo, es importante mencionar que en Michoacán, utilizando la tecnología del macrotúnel la producción se prolonga hasta el mes de agosto: actualmente existen más de 500 Ha con este sistema (CONAFRESA, 2008).

**Cuadro 1.** Porcentaje de producción, valor, rendimiento y superficie sembrada de fresa por entidad federativa en 2008 de acuerdo al SIAP-SAGARPA (2009).

| Entidad Federativa | Superficie sembrada (ha) | Producción (ton) | Rendimiento (ton/ha) | Valor de la producción (miles de pesos) | Participación (%) |
|--------------------|--------------------------|------------------|----------------------|-----------------------------------------|-------------------|
| Baja California    | 1,355.00                 | 70,410.70        | 51.96                | 580,680.57                              | 39.30             |
| Guanajuato         | 1,055.00                 | 18,065.80        | 17.24                | 137,448.30                              | 9.50              |
| México             | 244.00                   | 5,068.00         | 20.77                | 36,242.80                               | 2.5               |
| Michoacán          | 3,215.00                 | 106,905.85       | 33.25                | 637,267.46                              | 42.50             |
| Otros              | 318.50                   | 8,481.90         | 16.4                 | 91,184.80                               | 6.20              |
| Total              | 6,214.00                 | 208,932.25       | 33.86                | 1,482,823.93                            | 100.00            |

Para el Estado de Michoacán, el cultivo de la fresa se ha convertido en una actividad productiva y con gran futuro en el desarrollo de la economía notable, tanto por el aumento en los niveles de producción, industrialización y ampliación de la infraestructura productiva, como por el número de empleos que genera en la época de cosecha y de las diversas actividades que se desarrollan en torno a la agroindustria, comercialización y abastecimiento (Medina y Aguirre, 2007).

Las regiones productoras de Michoacán (Cuadro 2) son los Valles de Zamora y Maravatío, donde se ubica la mayor parte de los 1994 productores de fresa con que cuenta el Estado de acuerdo a información de la SAGARPA-MICHOACÁN

(2008)<sup>6</sup>. Donde la producción de fresa se destina en un 30% al mercado nacional y el 70% al mercado internacional Estados Unidos de Norteamérica, Inglaterra, Italia, Alemania, Francia y Japón.

El Valle de Zamora es la región más importante en cuanto a superficie cultivada de fresa, volumen de producción, mano de obra empleada y número de empresas agroindustriales procesadoras establecidas. Dentro de los municipios freseros del Valle de Zamora, de acuerdo a la superficie sembrada en el ciclo 2008, fueron en orden de importancia: Zamora con 1,084Has, Jacona 600Has, Tangancicuaro 300Ha e Ixtlán 220 Ha (SIAP-SAGARPA, 2009).

Las principales variedades cultivadas en el estado son: Camarosa, Tioga, Pico de Pájaro, Parker, Chandler, Oso Grande y Seascape (SAGARPA-MICHOACÁN, 2008).

**Cuadro 2.** Superficie, cantidad y rendimientos por municipio de productores de fresa en Michoacán en el año 2008 (SIAP-SAGARPA, 2009).

| <b>Municipio</b>    | <b>Sup. Sembrada<br/>(Ha)</b> | <b>Producción<br/>(Ton)</b> | <b>Rendimiento<br/>(Ton/Ha)</b> |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Angamacutiro        | 95                            | 2,850.00                    | 30                              |
| Brisedas            | 2                             | 39.92                       | 19.96                           |
| Chavinda            | 32                            | 992                         | 31                              |
| Hidalgo             | 43                            | 344                         | 8                               |
| Irimbo              | 15                            | 90                          | 6                               |
| Ixtlán              | 220                           | 6,820.00                    | 31                              |
| Jacona              | 600                           | 24,000.00                   | 40                              |
| Jiménez             | 10                            | 200                         | 20                              |
| José Sixto Verduzco | 8                             | 232                         | 29                              |
| Maravatío           | 420                           | 8,400.00                    | 20                              |

<sup>6</sup> SAGARPA - MICHOACÁN. 2008. Delegación de la SAGARPA en el Estado de Michoacán. En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/dlg/michoacan/agricultura/fomento/cultivos/html>.

|               |                 |                   |              |
|---------------|-----------------|-------------------|--------------|
| Pajacuarán    | 65              | 1,298.05          | 19.97        |
| Panindícuaro  | 96              | 1,344.00          | 14           |
| Periban       | 14              | 392               | 28           |
| Puruandiro    | 34              | 1,020.00          | 30           |
| Los Reyes     | 28              | 784               | 28           |
| Tangamandapio | 14              | 392               | 28           |
| Tangancicuaro | 300             | 15,300.00         | 51           |
| Tlazazalca    | 8               | 224               | 28           |
| Tuxpan        | 88              | 630               | 7.16         |
| Vista Hermosa | 6               | 119.88            | 19.98        |
| Zamora        | 1,084.00        | 41,203.00         | 38.01        |
| Zitácuaro     | 33              | 231               | 7            |
| <b>Total</b>  | <b>3,215.00</b> | <b>106,905.85</b> | <b>33.25</b> |

### 3.2. Antracnosis de la fresa *Colletotrichum acutatum* Simmonds

#### 3.2.1. Importancia

*Colletotrichum acutatum* es uno de los patógenos vegetales más importantes a nivel mundial, el cual ocasiona pérdidas económicas considerables en agricultura. Es de gran impacto en frutales tanto en áreas de climas templados como subtropicales y tropicales además de estar presente en una amplia gama de cultivos y plantas no cultivadas (Peres *et al*, 2005; Wharton y Diéguez, 2004).

De acuerdo a Denoyes *et al* (2005), la antracnosis de la fresa causada por *C. acutatum*, es una enfermedad de principal importancia en fresa tal que en Europa es considerada como plaga de cuarentena y aunque con prácticas culturales como manejo del riego y uso de acolchados se reduce significativamente la dispersión y el consecuente daño en fruto, no existen técnicas o herramientas químicas eficientes para el manejo de esta

enfermedad. Además de que las técnicas de resistencia varietal o biológica están poco desarrolladas o bien solo encaminadas al problema en corona y no en fruto donde se registran las mayores pérdidas (Denoyes *et al*, 1999).

De acuerdo a Mertely y Legard (2004) por la importancia económica de este patógeno, *Colletotrichum acutatum* fue clasificado como organismo de significancia cuarentenaria en Canadá de 1991 a 1997 (Política de protección vegetal 97-03) y en el Reino Unido y comunidad europea desde 1993 (EC directiva 77/93).

La importancia que tiene este género de patógenos en la agricultura ha llevado a desarrollar investigación en áreas como biología, histología en el proceso de infección, especificidad de hospedante, interacción planta patógeno, diversidad genética y epidemiología (Wharton y Diéguez, 2004).

Por lo mismo se sabe que la mayoría de especies del género *Colletotrichum* provocan daños en todos los estados de desarrollo de las plantas, causando la enfermedad conocida típicamente como antracnosis y en especial *C. acutatum* es de las especies más patogénicas que afecta un amplio número de hospedantes en diversas etapas de desarrollo (Freeman *et al*, 1998). Tal es el caso de almendro (*Prunus dulcis*), aguacatero (*Persea* spp.), duraznero (*Prunus pérsica*), arándano (*Vaccinium* spp.), cítricos (*Citrus* spp.), mango (*Mangifera indica*), olivo (*Olea europaea*), fresa (*Fragaria x ananassa*), entre otros (Freeman *et al*, 1998; Peres *et al*, 2005).

El uso de fungicidas en el control de agentes causales de la antracnosis en fresa es limitado debido a la falta de productos registrados para su uso en este cultivo, así como la imposición de restricciones en las moléculas fungicidas, sin mencionar que algunos aislamientos como es el caso de *C. fragarie* presentan cierta tolerancia a productos como benomilo, aun cuando se ha demostrado que

el empleo en conjunto con propiconazol puede reducir el índice de resistencia (De los Santos y Romero, 2002).

En México no se tienen estudios amplios sobre las pérdidas que causa esta enfermedad, además de carecer de precisión en la caracterización del agente(es) causal(es) de la antracnosis, sin embargo Mendoza (1987) reportó una pérdida por daño de antracnosis de fruto variable para cada variedad, en donde Aiko resultó ser la más susceptible registrando hasta un 80% de daño en fruto, Tioga solo presento un 50% y pájaro como menos susceptible.

Por otro lado Dávalos y Castro (1987) estudiaron la pérdida de producción en campos de fresa en Irapuato, a causa de pudriciones (rezaga), donde los daños causados por los hongos *Phytophthora cactorum* y *Colletotrichum* sp fueron los más altos. El porcentaje de daño varió entre 13.3 y 38.7%, en donde *Colletotrichum* ocasionó los mayores daños durante todo el tiempo de evaluación del experimento a excepción de una sola fecha de evaluación. Así mismo determinaron que durante los meses lluviosos y calientes los problemas fueron más fuertes tanto por incidencia de la enfermedad como por afectar en temporada de precios altos en el mercado.

### 3.2.2. Origen y distribución

*C. acutatum* se reportó por primera vez como especie diferente por Simmonds, ya que anteriormente se le consideraba como aislamientos de *C. gloesporioides* y como especies del género *Gloesporium*. Esto debido principalmente a que *C. acutatum* ataca a muchos hospedante que otras especies de *Colletotrichum* afectan, tal es el caso del complejo de especies causando antracnosis en fresa *C. gloesporioides*, *C. fragariae* y *C. acutatum* y de ahí también su dificultad en diferenciarlos (Mackenzie y Peres, 2007; Peres et al, 2005).

La enfermedad se presenta en todas las zonas productoras del mundo, principalmente en zonas tropicales y subtropicales, debido a que presenta amplio rango de hospederos principalmente frutales como aguacate, mango, cítricos, frutillas, etc. Se le ha encontrado en México, Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, India, Sudáfrica, Sri Lanka, Argentina y Puerto Rico. En México la antracnosis se encuentra distribuida en todas las entidades federativas (Téliz *et al*, 2007). *Glomerella* (*Colletotrichum*) se encuentra en todo el mundo, pero en general abunda más en zonas tropicales y subtropicales que en zonas templadas (Smith *et al*, 1992).

Por su parte Peres *et al*. (2005) indican que *C. acutatum* es cosmopolita en su distribución y causa enormes pérdidas económicas año con año. Y los hospedante son tan diversos como dicotiledóneas, entre ellas fresa, manzano, cítricos, frutales de hueso, así mismo en helechos y hasta pinos. Sin embargo aun no hay reportes de ataques en pastos, pero si se cree que existan más nichos poco estudiados.

*Colletotrichum gloesporioides* fue responsable de una epidemia de antracnosis con pudrición de corona en viveros de fresa en Arkansas y Carolina del Norte a finales de los años 70's. El patógeno causante de la antracnosis con pudrición de fruto *C. acutatum*, fue reportado por primera vez en 1986 atacando fresa en los Estados Unidos de América. A partir de esta década, las pérdidas económicas debido a la antracnosis de fruto y corona se incrementaron en los Estados Unidos (Smith, 2008).

Para el caso de México, Martínez y del Río (1975) reportan a la antracnosis (*Colletotrichum* spp.) como una de las enfermedades más comunes de las zonas productoras de fresa. Por otro lado Castro y Dávalos (1987) señalan a *Colletotrichum* sp., como uno de los agentes causales de la pudrición de frutos en Irapuato, Gto. Para la zona de Zamora, Mich., Téliz *et al*. (1986), reportaron

a especies de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Colletotrichum* y *Verticillium* como los principales hongos patógenos en fresa.

### **3.2.3. Agente causal**

De acuerdo a Smith (2008) la antracnosis en fresa es causada por tres especies de *Colletotrichum*, no obstante el hongo fitopatógeno *C. fragariae*, puede infectar cualquier parte aérea de la planta de fresa, sin embargo la enfermedad es más severa cuando el hongo infecta la corona, causando pudrición de corona, marchitez y muerte. *C. gloesporioides* es responsable de la antracnosis de corona o pudrición de corona y la antracnosis de fruto o pudrición de fruto es causada por el patógeno *C. acutatum*.

Por otro lado Freeman *et al.*, (1998), señalan que *C. acutatum* puede afectar cualquier parte de la planta, como son raíces, hojas, flores, yemas y frutos, dando como síntomas defoliación, tizón de flores, pudrición de corona, raíz y fruto. Sin embargo el principal problema es cuando los daños se presentan en fruto (Peres *et al.*, 2005).

Por su parte Castro y Dávalos (1987) al hacer la identificación de los patógenos involucrados en la pudrición de frutos en cultivo de fresa en Irapuato, encontraron a *Colletotrichum* sp y *Phytophthora cactorum* como agentes causales.

#### **3.2.3.1. Taxonomía**

Peres *et al.*, (2005), señalan que *C. acutatum* es un ascomiceto clasificado en la clase Pyrenomycetes e incluido en la familia Phyllacoraceae.

De acuerdo a la clasificación del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés)<sup>7</sup> el patógeno *C. acutatum* causante de la “antracnosis” o “podrición de fruto” se encuentra en:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Sordariales

Familia: Glomerellaceae

Genero: *Glomerella* (*Colletotrichum* sp.)

Especie: *G. acutata* (*C. acutatum*)

La clasificación de acuerdo a Agrios (2007) es la siguiente:

Reino: Mycetae

División: Eumycota

Clase: Coelomycetes

Orden: Melanconiales

Genero: *Glomerella* (*Colletotrichum* sp.)

Especie: *G. acutata* (*C. acutatum*)

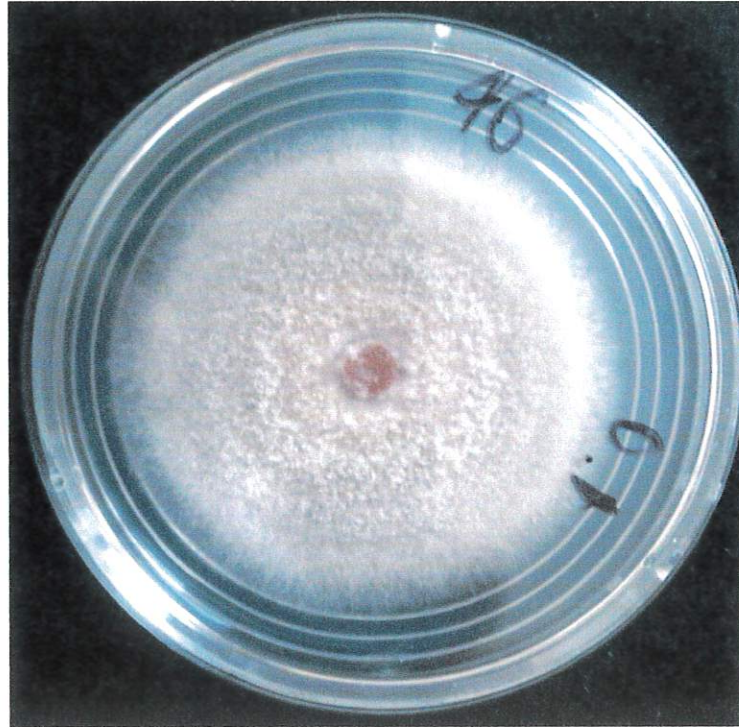
### 3.2.3.2. Morfología

Las colonias de *C. acutatum* son generalmente blancas los primeros días de crecimiento y eventualmente se cubren con masas conidiales de color rosa a naranja como se observa en la Figura 2. Algunos aislamientos provenientes de hospedante particulares son altamente cromogénicos y secretan pigmentos rojizos o rosáceos en el medio de cultivo. Generalmente la producción primaria de conidios es en acérvulos, sin embargo *C. acutatum* puede producir conidios secundarios sobre tejido vivo. Los conidios son elipsoides y fusiformes y con al

---

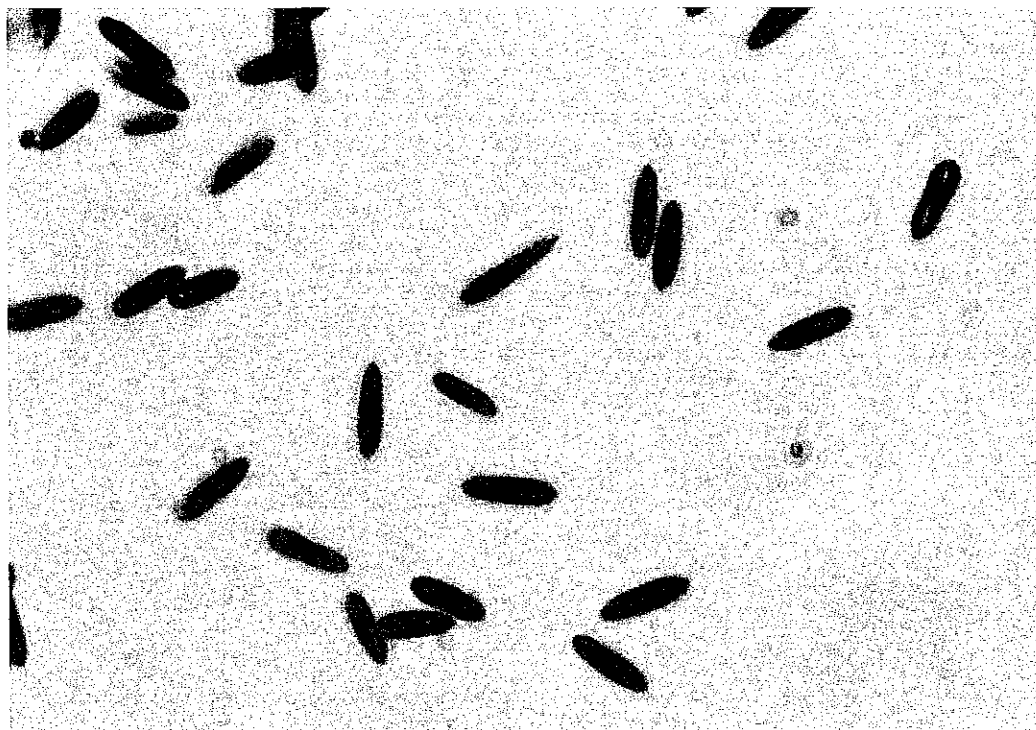
<sup>7</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>

menos un extremo redondeado, distinto a *C. gloesporioides* que típicamente presenta ambos extremos redondeados. No es común la presencia de setas, los apresorios son pigmentados y producidos al momento de la germinación del conidio y varían en forma y tamaño (Peres *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Colonia típica de *Colletotrichum acutatum* en medio de cultivo PDA.

De acuerdo a Farrera *et al.* (2007), los aislamientos de *C. acutatum* se caracterizan por la formación de colonias de color blanco con el centro gris oscuro, donde se destaca la presencia de coloraciones anaranjadas concéntricas tanto en el centro como en los márgenes. Los conidios son lisos, unicelulares (sin septas), fusiformes y de aproximadamente 10 - 14µm como se observa en la Figura 3. Se observan apresorios clavados de color marrón oscuro de 7 – 12 x 4 - 6µm.



**Figura 3.** Morfología típica de conidios maduros de *Colletotrichum acutatum*

Para separar *C. gloesporioides* de *C. fragariae*, la morfología, tamaño de conidios, setas y la presencia o ausencia de la fase sexual son características taxonómicas importantes, pero algunos aislamientos de *C. gloesporioides* no forman la fase sexual. Un método paralelo para la identificación de especies es usar las técnicas moleculares, como las que amplifican por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) las regiones internas ITS (Internal Transcribed Spacer) de los genes ribosomales. La identificación de una especie es importante para estudiar su etiología, epidemiología y para establecer estrategias de manejo (Villanueva *et al.*, 2005).

#### **3.2.3.3. Identificación y diagnóstico con técnicas moleculares**

La identificación a especie del género *Colletotrichum* ha sido realizada tradicionalmente empleando métodos clásicos en micología como es aislamiento de material enfermo, seguido de identificación morfológica, sin embargo a partir de 1991, muchos métodos moleculares han sido desarrollados

y ampliamente aplicados para mejorar la caracterización y diferenciación entre especies de *Colletotrichum*. Estos métodos incluyen comparación de isoenzimas, polimorfismo de longitud de fragmento restringido RFLP (restriction fragment length polymorphism), análisis de DNA mitocondrial, AFLP polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (amplified fragment length polymorphism), AT-rich análisis, amplificación aleatoria de DNA polimórfico RAPD (random amplified polymorphic DNA), desarrollo de iniciadores (primers) PCR específicos para género o especie de *Colletotrichum* y ensayos ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) (Garrido *et al*, 2009).

La identificación adecuada de organismos patógenos de las plantas cultivadas es importante en la implementación de estrategias para el manejo y control de enfermedades. Particularmente se requiere la caracterización fenotípica y genética de los patógenos de plantas persistentes en un área determinada. La aplicación de técnicas moleculares, permite clarificar las relaciones genéticas de los grupos de hongos fitopatógenos, principalmente cuando los criterios morfológicos de clasificación son variables. El uso de técnicas moleculares permite la identificación de organismos fitopatógenos de forma certera por estar basado en la composición del ADN (Calle, 2005).

La amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleídos tiene una alta sensibilidad para diferenciar entre aislamientos, por ejemplo, se pueden discriminar con precisión diferentes cepas de *Fusarium oxysporum* o algún otro hongo. El uso de marcadores moleculares permite además procesar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo (Alves *et al.*, 2002).

Shi *et al.* (2008), diseñaron dos pares de "primers" o iniciadores específicos para producir fragmentos PCR exclusivamente para lisis por lacasa o pectasa del gen B de *C. gloesporioides*. Dos pares de iniciadores adicionales se diseñaron para producir fragmentos PCR específicos para glutamina sintetasa o para gen de patogenicidad de *C. acutatum* causante de antracnosis en limón.

Estos resultados o productos representan herramientas útiles para identificar y distinguir entre especies del *Colletotrichum* además de ser una mejora más en la precisa caracterización de genes relacionados a la patogenicidad.

White *et al.* (1990) citado por Calle (2005) diseñaron y describieron iniciadores específicos para amplificar y secuenciar varios segmentos del rDNA mitocondrial y nucleico de hongos, abriendo la posibilidad de realizar estudios filogenéticos utilizando estos genes.

Freeman *et al.* (1998) realizaron la identificación molecular del agente causal de la pudrición de frutos de fresa con síntomas típicos de antracnosis y mediante la amplificación de Calnt2 e ITS4, lograron caracterizar y relacionar en un 100% de similitud sus cepas con aislamientos almacenados en bases de datos correspondientes a *C. acutatum*.

Los análisis moleculares se utilizan en la identificación de bacterias, hongos y nematodos fitopatógenos, especialmente para géneros dentro de los cuales las especies tienen características morfológicas coincidentes entre ellas. La detección o diagnóstico molecular podría ser más útil a partir de tejido vegetal y/o muestras de suelo directamente, además de que su uso en combinación con técnicas serológicas como ELISA, incrementan la sensibilidad y previenen problemas con inhibidores de productos PCR, tan comunes en plantas. Sin embargo, se necesitan de mayores avances, principalmente en el desarrollo de técnicas más confiables y disponibles para la extracción de ADN y/o ARN de tejido vegetal o suelo para emplear en laboratorios de diagnóstico (Martin *et al.*, 2000).

#### **3.2.4. Sintomatología**

Los síntomas provocados en fresa por las tres especies son similares e incluyen lesiones en estolones, peciolo, pudrición de fruto, manchas foliares o pudrición

de corona. Este último síntoma es muy destructivo en campos de producción de fruto, debido a que las plantas se debilitan y mueren. Las plantas infectadas por el inóculo secundario reducen su rendimiento (De los Santos y Romero, 2002).

La antracnosis es causada por varias especies de *Colletotrichum*, ocasionando un daño importante en una amplia variedad de cultivos hortícolas y frutales en todo el mundo. Esta enfermedad se puede presentar en hojas tallos, en frutos en etapa de precosecha y postcosecha. El síntoma típico en frutos se puede observar en la Figura 4, se presenta como lesiones circulares o angulares deprimidas que producen masas conidiales de coloración rosa a naranja. En etapas avanzadas las lesiones pueden coalescer. Las masas de conidios formadas se pueden desarrollar sin formar patrones o anillos concéntricos sobre la lesión (Lewis *et al.*, 2004).



**Figura 4.** Lesión característica de antracnosis en frutos de fresa.

La enfermedad puede presentarse en cualquier parte de la planta pero ocurre principalmente en frutos, flores y estolones. Las primeras infecciones aparecen como pequeñas lesiones de color café o negro, de forma angular o irregular que se fusionan para formar áreas necróticas. En hojas viejas, las lesiones son oscuras, angulares o sub-circulares, alcanzando un diámetro máximo de 3 cm

con acérvulos en ambas superficies de la hoja. El tizón de flores y pudrición de frutos son los síntomas más comunes en campos de cultivo, mientras que en viveros, el ahogamiento de estolones y daño en hojas y peciolo son visibles. En algunas regiones, se observa la pudrición de corona y muerte total de planta (Leandro *et al*, 2001; Téliz y Mora, 2007).

Las infecciones de la planta madre resultan en un colapso de la planta, así como la inhibición de brotes nuevos y la pudrición de corona o en lesiones avanzadas puede haber muerte total de la planta. Las infecciones se vuelven más agresivas bajo condiciones de alta humedad y temperaturas superiores a los 15 °C y menores a 35 °C. En vivero el principal problema es el ahorcamiento de estolones y con ello muerte de plantas nuevas por falta de enraizamiento (Freeman y Katan, 1997).

Cítricos, mangos, papayas y aguacates son afectados por *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. En cítricos es un saprófito común y puede causar antracnosis en postcosecha debido a las infecciones ocurridas en precosecha que permanecen quiescentes, a diferencia de *C. acutatum* que no produce antracnosis en postcosecha en frutos de cítricos; pero causa distintas enfermedades como son caída de frutos después de la floración y el “clavo” de la lima. En manzano, la pudrición amarga es causada tanto por *C. gloeosporioides* como por *C. acutatum*. Sin embargo, en hojas de manzano *C. acutatum* no se ha reportado a diferencia de *C. gloeosporioides* (Peres *et al.*, 2005).

### **3.2.5. Ciclo biológico de la enfermedad**

El material de propagación y el suelo procedente de piezas de trasplante, parecen ser la principal fuente de inoculo para nuevas infecciones, especialmente en sistemas de producción anual. Para *C. fragariae* esto es aun más cierto ya que tiene un rango limitado de hospedante y no sobrevive en

suelo más allá del verano. En sistemas perennes, el hongo puede sobrevivir en plantas infectadas y residuos, para favorecer la infección en la siguiente etapa de fructificación. Las esporas (conidios) pueden ser dispersadas por viento, lluvia o lluvia con viento, además por salpicaduras, por insectos, por los mismos trabajadores al moverse dentro del cultivo, en el equipo y por animales (Mass, 1998). El desarrollo de la enfermedad y su dispersión generalmente son mínimas bajo condiciones de baja temperatura y humedad. Las infecciones de corona a menudo ocurren en el vivero pero no se reflejan sino hasta después del trasplante. De esta manera el hongo continua desarrollándose en estas plantas infectadas y mueren súbitamente bajo condiciones calientes y húmedas, generalmente sucede a finales del otoño o inicios de primavera del año siguiente (Wharton y Diéguez, 2004; Turecheck y Heidenreich, 2005).

La antracnosis es considerada una enfermedad de condiciones cálidas y húmedas donde las temperaturas óptimas oscilan entre 26 y 32 °C. Aunque las infecciones en fruto por *C. acutatum* ocurren a los 20 °C, tanto la germinación conidial como la infección necesitan 100% de humedad relativa para que sucedan (Turecheck y Heidenreich, 2005).

Las esporas de *C. acutatum* pueden sobrevivir en suelo y residuos de plantas bajo condiciones secas por más de 12 meses, pero mueren rápidamente bajo condiciones de humedad, por ejemplo cuando la humedad del suelo es mayor al 12%. Cuando una planta de fresa es colocada en suelo infestado de esporas, la infección puede originarse por salpicaduras a la corona o a los tallos durante la lluvia o el riego. En el caso de suelos fumigados la infección generalmente proviene de los viveros o de plantas infectadas de campos vecinos o bien de malezas hospedadoras del patógeno. Mientras en otros cultivos frutales y hortalizas se sabe que son hospederos de *C. acutatum*, por medio de análisis molecular se determinó que las poblaciones en fresa se reproducen asexualmente y tienen una limitada diversidad (Smith y Cochran, 2009).

Las infecciones en plantas madre con *C. acutatum*, que desarrollan pudrición de brotes y eventualmente pudren la corona, dan como resultado el colapso y la muerte de la planta. En el vivero, las lesiones formadas sobre estolones, que con el tiempo los ahorcan, generarán el debilitamiento del sistema radicular de las nuevas plantas. Los patógenos *C. gloesporioides* y *C. fragariae* causan síntomas similares a los que ocasiona *C. acutatum*. El material de trasplante infectado es capaz de dispersar enfermedad del vivero al campo, en donde los síntomas típicos de la antracnosis se manifiestan más tarde como manchas negras irregulares en hojas, pudrición de la corona, tizón de flores y pudrición de frutos (Freeman y Katan, 1997).

*Colletotrichum acutatum* puede sobrevivir en muchas especies de plantas cultivadas como son chile, tomate, frijol, berenjena e incluso malezas sin causar síntomas de enfermedad. Esto indica que tales hospedantes pueden servir como inóculo potencial o reservorio para infectar en cultivo de fresa entre temporadas. Aunque *C. acutatum* sobrevive en suelo bajo ciertas condiciones, no se han encontrado estructuras de resistencia específicas que indiquen que el patógeno no actúe como un hongo de suelo (Freeman, 2008).

En el caso de *C. gloesporioides* en el cultivo de mango Ramírez (1991) mencionó que el patógeno penetra en los frutos jóvenes y puede permanecer latente y desarrollará posteriormente cuando el fruto empiece a madurar. El hongo puede atacar muchos otros frutales, tales como papayos, cítricos, mango, etc. en donde se desarrolla como saprofita en las ramillas muertas y esporula profusamente cuando hay condiciones favorables. Para que la infección se lleve a cabo, es necesario que la humedad relativa sea mayor de 95% por un periodo mínimo de 12 horas. Las esporas del hongo se diseminan fácilmente por medio de salpicaduras de agua de lluvia. Los conidios y las ascosporas pueden permanecer viables por 3 años y de esta manera servir como fuente de inóculo primario.

De acuerdo con Leandro *et al.*, (2001), la germinación y esporulación de *Colletotrichum acutatum* se estudió en hojas de fresa (cv Tristar) cubiertas con películas plásticas, las cuales se incubaron una temperatura de 26° C bajo condiciones de humedad continua. La germinación de los conidios se presentó tres horas después de la inoculación y se formaron apresorios melanizados nueve horas después de la inoculación. La penetración en el hospedante se observó siete días después de la inoculación. La producción de inóculo secundario en forma de hifas y conidios se presentó seis horas después de la inoculación. Esta producción secundaria es responsable del incremento en más de tres veces del total de conidios a siete días después de la inoculación. El inóculo primario comienza a colapsarse 48 horas después de la inoculación, mientras los apresorios melanizados permanecen intactos. Estos reportes sugieren que los apresorios y conidios secundarios de *C. acutatum*, producidos en el follaje asintomático de fresa, puede ser una fuente de inóculo importante para la infección de frutos.

En otro estudio Leandro *et al.* (2003), determinaron que las temperaturas óptimas de germinación y desarrollo de apresorios son entre 23 a 27.7 °C y 17.6 a 26.5 °C respectivamente, bajo condiciones de humedad continua. Además la conidiogénesis secundaria se presenta a temperaturas entre 21.3 a 32.7 °C y es más abundante a partir de las 12 horas después de la inoculación. Así mismo se determinó que *C. acutatum* puede sobrevivir alrededor de 8 semanas sobre las hojas aun sin la presencia de síntomas.

### **3.2.6. Interacción planta-patógeno**

De acuerdo a Smith (2008), las plantas de fresa que crecen en suelos con altos contenidos de nitrógeno, son más susceptibles al ataque del agente causal de la antracnosis, que aquellos que se desarrollan en suelos con niveles más bajos de nitrógeno o aquellos adicionados con nitrato de calcio. También se determinó que la antracnosis se dispersa más rápidamente en campos que

presentan riego elevado y tecnología de cubiertas plásticas que en campos donde se emplea el riego por goteo y cubiertas vegetales (pajas).

Las diferencias entre la incidencia y severidad de pudrición de frutos por antracnosis (PFA) en campo entre los distintos fenotipos de fresa, indican que posiblemente hay diferencia entre la susceptibilidad a PFA. Al respecto Shuman y Ballington (2003), realizaron una investigación inoculando 7 genotipos de fresa a 5 concentraciones de conidios de *Colletotrichum acutatum*. El estudio se realizó sobre frutos de distinto grado de maduración, midiendo el largo y ancho de las lesiones desarrolladas, así como el período de incubación. Para la mayoría de los genotipos la concentración que produjo las lesiones más grandes y el rango de desarrollo más rápido, correspondió a  $1 \times 10^5$  conidios/mL. Para el caso de la edad o etapa de madurez, los frutos inmaduros redujeron la probabilidad de enfermarse, incremento a media madurez y en frutos maduros creció rápidamente dicha probabilidad de enfermedad, sin embargo aunque fue un comportamiento similar (curva respuesta), los niveles variaron entre los genotipos. Por el contrario el período de incubación no varió entre genotipos, ni entre concentraciones de inóculo ni aun entre la interacción genotipo-concentración. Finalmente se determinó que la tasa de desarrollo de PFA fue distinta entre genotipos. Estos resultados sugieren que el genotipo, edad y cantidad de inóculo, son elementos relacionados con la resistencia a la enfermedad.

### **3.2.7. Manejo de la enfermedad**

De acuerdo a De los Santos y Romero (2002) con una aplicación de benomilo se puede prevenir la antracnosis en fresa, causada por *C. acutatum* siempre y cuando la infección no se haya dado. También mencionan que el Procloraz es efectivo en el control de esta especie.

Varios fungicidas fueron evaluados como herramientas por la habilidad para el control de esta enfermedad bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo. La dosis efectiva que causa el 50% de inhibición del crecimiento micelial, fue 0.5, 1, 1 y 2 ppm para los fungicidas propiconazol, bitertanol, imazalil y hexaconazol respectivamente. En invernadero, la incidencia de la enfermedad, evaluada en tres variedades de fresa, mostró que el tratamiento con propiconazol redujo la mortalidad (32 a 54%), pero causó un efecto pequeño de fitotoxicidad lo que trajo como resultado un crecimiento anormal en las plantas. En los experimentos en campo durante tres años se demostró que sumergiendo plantas en soluciones de carbendazim, betertanol y tiabendazol la incidencia de la enfermedad se redujo significativamente al momento del transplante (De los Santos y Romero, 2002).

En Francia el control de la antracnosis está limitado a tratamientos preventivos aplicados antes de la producción de frutos. Existen métodos no químicos efectivos para el control de la enfermedad. Entre las técnicas de control cultural están el riego por goteo, acolchados y los sistemas de producción bajo cubierta, que limitan considerablemente la dispersión del inóculo y de esta manera se reduce la pérdida de frutos. El uso de plantas libres del patógeno usualmente provee un nivel suficiente de control de la enfermedad. No obstante, la infección latente puede ocurrir en plantas aparentemente sanas, que presentan los primeros síntomas de antracnosis en campo. Por lo tanto, la selección de variedades resistentes es evidentemente la estrategia más eficiente y práctica del manejo de la enfermedad (Denoyes *et al.*, 1999).

Métodos actuales de selección evalúan la resistencia tanto de estolones, follaje y coronas. De este modo, los programas de resistencia a la antracnosis se enfocan en plántulas o plantas más que en el fruto. Empleando estos métodos de selección, genotipos aparentemente resistentes, como los comúnmente utilizados pueden mostrar lesiones de antracnosis de fruto en campo. De este modo, en estos programas se considera a la resistencia en frutos como un extra

al parámetro de selección. Por lo tanto, la resistencia a la pudrición de los frutos debe ser evaluada directamente sobre frutos (Denoyes *et al.*, 1999).

De acuerdo a Washington *et al.*, (1992), en condiciones de laboratorio los fungicidas fluazinam, thiram y dichlofluanida, ofrecen un control general alto, sobre pudriciones de fruto como son moho gris (*Botrytis cinerea*), pudrición cuerosa (*Phytophthora cactorum*) y mancha negra (*Colletotrichum acutatum*). Por otro lado los fungicidas dicarboxamidas y bencimidazoles ofrecen un pobre control.

De acuerdo a Téliz *et al.*, (2007), este patógeno puede ser controlado por una amplia gama de químicos a base de cobre, ditiocarbamatos, benzimidazoles y triazoles. Las aplicaciones con oxiclورو de cobre, manzate, benomilo son efectivas. Sin embargo se sugiere implementar una estrategia de manejo integrado que considere prácticas agronómicas en las etapas de pre y post cosecha y de ser posible apoyarse en criterios epidemiológicos por medio de trampas de inóculo primario y desarrollar modelos de predicción.

Para Poling *et al.* (2008), la mejor forma de controlar la enfermedad es prevenir la introducción del patógeno al campo, empleando material de propagación libre de inóculo. Por lo tanto la práctica más crítica es controlar la enfermedad en vivero.

Wedge *et al.*, (2007), evaluaron 16 fungicidas para el control de enfermedades de fruto en fresa, tales como antracnosis (*C. acutatum*), moho gris (*B. cinerea*) y pudrición apical (*Gnomonia comari*). Siete grupos químicos resultaron efectivos en el manejo, de las cuales las recomendaciones comerciales fueron las más efectivas. Tales mezclas comprenden pyraclostrobin + boscalid, cyprodinil + fludioxonil, azoxystrobin, fenhexamida + captan.

El control biológico de esta enfermedad se basa en organismos antagonistas y deberá integrarse cada vez más en las técnicas de control.

### **3.3. Fungicidas**

Los fungicidas preventivos o de contacto son activos en la superficie de los tejidos donde quedan después de ser aplicados. No ocurre movimiento del fungicida dentro de la planta. Por la misma razón la actividad del producto se pierde justo después de ser lavado o eliminado de la superficie y requiere de re-aplicaciones continuas. Estos fungicidas comúnmente previenen la germinación de esporas por lo tanto deben ser aplicados antes de ocurrida la infección ya que no tienen efecto una vez que el hongo crece dentro de la planta (Damicone y Smith, 2009).

El otro grupo de fungicidas son los penetrantes, estos son absorbidos por la planta después de ser aplicados y debido a esta condición son también llamados sistémicos. Sin embargo los fungicidas penetrantes tienen distinto grado de sistemicidad. Algunos fungicidas son “sistémicos locales”, que solo se mueven a cortas distancias como son un par de capas de células del tejido. Los fungicidas que se mueven de un lado de la hoja hacia el otro se conocen como translaminares. Los fungicidas translaminares y sistémicos locales no se transportan a través de la planta. Los fungicidas altamente móviles son también transportados por el xilema o “sistémicos verdaderos”. Los fungicidas móviles vía xilema se transportan hacia las partes aéreas de las plantas y hacia la periferia de las hojas junto con el agua por los vasos del xilema. Los fungicidas realmente sistémicos son aquellos que se mueven tanto hacia arriba por xilema como hacia abajo a través del floema, el tejido conductor de nutrientes. Solo un reducido número de fungicidas son completamente sistémicos. Y a diferencia de los profilácticos, los penetrantes escapan al lavado con pocas horas de haber sido aplicados y requieren menor cobertura para ser efectivos.

Así mismo, los fungicidas penetrantes muestran efectividad inhibiendo el crecimiento y esporulación del hongo y pueden ser efectivos cuando son aplicados en etapas tempranas de infección. Sin embargo nótese que aun siendo móviles estos productos tienen una limitada "habilidad curativa". Generalmente solo actúan dentro de las primeras 72 horas de haber ocurrido la infección, por lo tanto los fungicidas sistémicos deben ser aplicados antes o poco después de la infección y son inefectivos sobre lesiones existentes (Damicone y Smith, 2009).

### 3.3.1. Bencimidazoles

Los bencimidazoles son fungicidas sitio-específicos que interfieren con la división celular. Presentan movilidad o sistemicidad y tienen actividad sobre muchos grupos de hongos excepto los mohos acuáticos (*Pythium* y *Phytophthora*) y hongos oscuros (*Alternaria*). Investigaciones han demostrado que los aislamientos resistentes a los bencimidazoles están presentes en baja frecuencia en forma natural, aun en ausencia de exposición a fungicidas y bajo presión de selección, el desarrollo de resistencia es rápido, abrupto. Estos aislamientos resistentes no pueden ser controlados incrementando las aplicaciones en número o dosis. Las cepas resistentes son a menudo aptas y competitivas en naturaleza incluso en ausencia de presión de selección. Por lo tanto algunas poblaciones han permanecido resistentes aun después de discontinuar el uso de bencimidazoles por diez años. La resistencia a bencimidazoles se ha documentado en más de 60 enfermedades, sin embargo la resistencia cruzada con este grupo ha recibido poca atención recientemente y esto debido principalmente a que el fungicida benomilo no está registrado ampliamente en Estados Unidos. Sin embargo, el manejo de la resistencia en tiofanato metílico el otro bencimidazol mas usado, permanece importante (Damicone y Smith, 2009). Este fungicida se ha empleado extensamente desde la década de los 60's. Presenta un alto riesgo de generación de resistencia a una gran cantidad de patógenos, entre los que se encuentra *Botrytis cinerea*.

También se ha demostrado que existe resistencia cruzada entre este fungicida y otros del mismo grupo (benomil, carbendazim, tiabendazol) (FRAC, 2008) por lo que se recomienda monitorear constantemente las poblaciones de hongos para establecer tácticas anti-resistencia.

El manejo de la resistencia a bencimidazoles se enfoca en reducir la presión de selección limitando la exposición a la molécula y usando mezclas de tanque o alternando aspersiones con fungicidas de bajo riesgo de resistencia. En los casos donde se requieren múltiples aplicaciones para controlar la enfermedad, se debe evitar el uso de bencimidazoles por largos períodos. En beneficio de los bencimidazoles se debe señalar que también existen numerosos reportes que señalan la permanencia de efectividad del fungicida por más de treinta años (Damicone y Smith, 2009).

### **3.3.2. Inhibidores externos de la quinona (Qol) o estrobirulinas**

Las estrobirulinas, también conocidos como inhibidores externos de la quinona (Qol), son análogos sintéticos de un componente natural producido por un hongo degradador de madera. Las estrobirulinas inhiben la respiración de las células de los hongos, atacando una proteína (citocromo bc1) que está codificada por un gen en las mitocondrias. Estos fungicidas tienen un espectro de acción amplio con actividad contra la mayoría de hongos de importancia fitopatógena. Presentan movilidad translaminar, penetran por las hojas y se mueven al otro lado de ellas, lo cual los hace escapar del efecto de la lluvia pero carecen de sistemicidad verdadera en la planta a diferencia de otros fungicidas sistémicos. El sitio de acción involucra un amplio espectro de procesos incluyendo la germinación de esporas, crecimiento (división celular y reproducción (esporulación)). Las estrobirulinas han sido registradas en muchos cultivos debido a su amplio espectro de acción y a sus excelentes perfiles de seguridad al ambiente y al humano. Sin embargo, al igual que los bencimidazoles la resistencia a este grupo se desarrollo poco después de haber

sido introducidos al mercado a finales de los 90's. Tres diferentes mutaciones de un gen se han identificado como las causas de las mutaciones y que han sido documentadas para más de 20 enfermedades. Los aislamientos resistentes también presentan resistencia cruzada a todos los demás fungicidas estrobirulinas, pero no con otros grupos de diferente modo de acción, incluyendo los muy cercanos como son los fungicidas Qil (Quinone inside inhibitors). Los programas de manejo de resistencia se enfocan a la reducción de la presión de selección manteniendo presiones de enfermedad bajas, aplicando estrobirulinas en mezcla o alternando con fungicidas de diferente modo de acción y limitando el número de aplicaciones por temporada. Muchos fungicidas estrobirulinas ya se comercializan en mezclas con fungicidas no-Qil para emplearse en diferentes cultivos (Damicone y Smith, 2009).

El azoxystrobin presenta propiedades profilácticas, curativas, erradicantes y sistémicas. La sistemicidad se aprecia al ser absorbido por las raíces y este es translocado por el xilema hacia los tallos y hojas, o bien cuando se absorbe por la superficie de las hojas y se mueve hacia los borde de las hojas o hacia brotes en crecimiento. El modo de acción es inhibiendo la respiración de los hongos a nivel de mitocondrias. Este fungicida inhibe la germinación de conidios, crecimiento micelial y producción de esporas. El azoxystrobin es activo a dosis muy bajas en contra de un amplio rango de hongos fitopatógenos (Damicone y Smith, 2009).

### **3.4. Estudios de sensibilidad de *Colletotrichum* a fungicidas**

De acuerdo con Mondal *et al.*, (2005) *Elsinoe fawcettii* y *Diaphorte citri* son patógenos de cítricos que junto con *C. acutatum* y *Micosphaerella citri* son controlados con estrobirulinas y sus DE<sub>50</sub> son bajas para los dos primeros y ligeramente elevadas para los segundos. En el caso a Azoxystrobin son de 0.4 µg/ml para *C. acutatum* y 1.62 µg/ml para *M. citri* en comparación con valores inferiores a 0.08 µg/ml para *E. fawcettii* y *D. citri*. Para otra estrobirulina el

Pyraclostrobin los valores son inferiores donde *C. acutatum* reporta una DE<sub>50</sub> 0.029 µg/ml. Pero para moléculas como los triazoles (Fenbuconazol) *C. acutatum* reporta valores DE<sub>50</sub> superiores a 1 µg/ml.

De acuerdo a Wong *et al* (2008) los valores de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) para *Colletotrichum cereale* al tiofanato metílico variaron de 0.14 a 2.3 µg/ml con una media de 0.75 µg/ml en sesenta aislamientos provenientes de pastos en California que no han sido expuestos a fungicidas. Sin embargo en 60 aislamientos expuestos evaluados solamente tres fueron sensibles al tiofanato metílico a una concentración superior a 30 µg/ml, a su vez, los aislamientos no sensibles también fueron insensibles al benomilo *in vitro*. De la misma manera dos aislamientos insensibles al benomilo o al tiofanato metílico no se controlaron *in vivo* con cualquiera de estos fungicidas en plantas tratadas preventivamente a una dosis de 11 mg/ml, lo cual confirmó los resultados de la prueba *in vitro*. De un total de 361 aislamientos, de 6 localidades distintas de California, más del 90% se mostraron resistentes al tiofanato metílico empleando como dosis discriminadora 10 µg/ml.

Los bencimidazoles son fungicidas de amplio espectro que se han usado comercialmente para el control de enfermedades de plantas desde la década de los 60's. Cuando fueron introducidos, representaron una clase pionera de fungicidas con propiedades únicas, incluyendo actividad sistémica y curativa que permitió espaciar más las aplicaciones. En todo el mundo, los bencimidazoles se han registrado en más de 70 cultivos incluyendo cereales, frutales y hortalizas. Actualmente incluyen los siguientes ingredientes activos: benomil, carbendazim, tiabendazol, tiofanato, metil-tiofanato y fuberidazol. Este grupo químico representa el inicio de problemas graves de resistencia a fungicidas. A los pocos años de su introducción se registraron disminución en la capacidad de control en muchos cultivos, especialmente con patógenos que tienen varios ciclos por año. Desde que se comenzaron a comercializar, al

azoxystrobin y propiconazol, que todos los aislamientos crecieron sin ser inhibidos a una concentración discriminatoria de 10µg/ml de tiofanato metílico, siendo el 86% de cepas, insensibles al azoxystrobin y para el caso del propiconazol, la sensibilidad (dosis efectiva 50) osciló entre 0.23 a 1.33µg/ml, lo cual sugiere una dispersión de resistencia a bencimidazoles y estrobirulinas entre cepas de *C. cereale* causantes de antracnosis en céspedes de Carolina del Norte y estados circundantes. En relación a la generación de resistencia Young *et al* (2009) mencionan que los aislamientos de *C. cereale* exhiben una sustitución de aminoácidos en el gen para beta tubulina.

Por otro lado Wong *et al* (2007) evaluaron la sensibilidad de *C. cereale* a fungicidas Qol's, colectados en campos de golf de California. Los resultados reflejaron que la DE<sub>50</sub> se encuentra entre 0.006 a 0.089µg/ml de azoxystrobin entre las cepas no expuestas a aplicaciones con estos fungicidas y para el caso de las cepas expuestas, su inhibición no fue total aun con dosis tan altas como 8µg/ml. Para el caso de los otros fungicidas, se encontró una respuesta muy parecida, lo cual sugiere una alta actividad de resistencia cruzada.

Por otro lado Zavala *et al.* (2005) realizaron una evaluación de fungicidas sobre el control del agente causal de la antracnosis en papaya cv maradol (*C. gloesporioides*) donde se comprenden etapas *in vivo* e *in vitro*, donde los resultados arrojan una DE<sub>50</sub> para azoxystrobin en inhibición micelial de 258.12µg/ml.

Cincuenta y uno aislamientos de 10 frutales, acacias y árbol de te fueron evaluados en su sensibilidad al tiofanato metílico, dietofencarb e iminoctadina triacetato, así mismo se analizaron molecularmente mediante las regiones ITS y 5.8 del rDNA. Los aislamientos de *C. gloesporioides* se clasificaron por su respuesta ante los tres fungicidas como sensibles, poco sensibles, medianamente resistentes y resistentes. En contraste, *C. acutatum* se clasificó por completo como poco sensible. En cuanto al análisis molecular se refiere, los

aislamientos de *C. gloesporioides*, se ubicaron en un mismo grupo genético, mientras que los aislamientos de *C. acutatum* se ubicaron en dos grupos genéticos. Aunque no se encontró una relación filogenética en base a la sensibilidad, si se observó que los aislamientos resistentes al iminoctadina triacetato, compartieron el mismo grupo filogenético (Chung *et al.*, 2006).

Cinco aislamientos de *C. gloesporioides* presentaron un valor de DE<sub>50</sub> superiores a 100mg/l de tiofanato metílico y se agruparon como altamente resistentes, mientras que tres aislamientos presentaron valores de DE<sub>50</sub> entre 10 y 100 mg/l y se clasificaron como medianamente resistentes y 21 aislamientos que presentaron valores DE<sub>50</sub> menores a 1mg/l se clasificaron como sensibles. Por otro lado, los aislamientos de *C. acutatum* fueron inherentemente menos sensibles a los tres fungicidas, cuyos valores de DE<sub>50</sub>, excluyendo un aislamiento se encontraron entre 1 a 10mg/l de tiofanato metílico, mas de 100mg/l para dietofencarb y entre 100 a 1000mg/l de iminoactadina (Chung *et al.*, 2006).

La caída de fruto pos floración de los cítricos causado por *C. acutatum* produce lesiones marrón en los pétalos que resulta en una caída prematura de frutos y retención de los cálices. *C. gloesporioides* causa antracnosis poscosecha en frutos y ambas son enfermedades comunes en huertas comerciales que son controladas aceptablemente con el fungicida benomilo a nivel comercial y experimental. En un estudio realizado por Peres *et al* (2004), los aislamientos de *C. gloesporioides* resultaron ser tanto altamente susceptibles como resistentes al benomilo, a diferencia de los aislamientos de *C. acutatum* que resultaron ser moderadamente resistentes sin distinción entre ellos. Los aislamientos de *C. gloesporioides* considerados susceptibles fueron inhibidos a una concentración de 1.0µg/ml, mientras que los considerados resistentes crecieron sin problemas a 10µg/ml. El 55% del desarrollo del hongo *C. acutatum* fue inhibido a 0.1µg/ml. La germinación de esporas de *C. acutatum* fue inhibida mas a 0.1µg/ml que a 1.0µg/ml o aun concentraciones más altas.

En el trabajo anterior, se indica que todos los aislamientos se colectaron de diferentes ambientes o con historiales diferentes en cuanto al uso de benomil se refiere, así mismo, el análisis estadístico señala que la sensibilidad de los aislamientos de *C. acutatum* no se vio afectada por el historial de uso del benomilo, ni por el origen de colecta o zona, ya que estos tuvieron mínimos efectos (Peres *et al*, 2004).

### **3.5. Generalidades sobre resistencia a fungicidas**

La resistencia de un organismo a un producto químico determinado, se da cuando su aplicación no causa el mismo efecto sobre las poblaciones del patógeno en las mismas concentraciones del fungicida. La resistencia ocurre cuando la reducción en eficacia se debe a la presencia de cepas resistentes del hongo problema, que inicialmente estuvo ausente. Este fenómeno afecta a la mayoría de los grupos químicos de fungicidas. Sin embargo, los casos más comunes son encontrados con los fungicidas sistémicos, los cuales frecuentemente poseen un sitio de acción bioquímica individual (compuestos de mono-sitio). dentro de las células del hongo, son altamente efectivos, de efecto persistente y amplia distribución dentro de la planta, por lo cual ejercen una fuerte presión de selección. Al presentarse el fenómeno de resistencia, existe un importante incremento en la frecuencia de las poblaciones del hongo con menor sensibilidad al producto químico (Brent, 1995; Rusell 1995; Staub, 1991).

La resistencia es una propiedad estable y hereditaria de un patógeno y se observa por qué se reduce la sensibilidad a un fungicida. Esta una vez establecida en la población, puede permanecer por tiempo indeterminado o desaparecer rápidamente (Georgopoulos, 1995).

El monitoreo de la resistencia se basa en el análisis de la respuesta de una población de un patógeno al uso del fungicida. Su principal objetivo es detectar

a tiempo cualquier cambio de sensibilidad, para poder tomar así las medidas adecuadas (Dekker, 1988).

**Mecanismos de resistencia:** El desarrollo de resistencia a un fungicida se debe a cambios en la célula del hongo que le impide al fungicida llegar al sitio de acción. Algunos cambios que pueden inducir resistencia según Dekker, (1995) son:

- **Menor permeabilidad de las membranas celulares:** Esta alteración impide que el fungicida alcance el sitio de acción disminuyendo el control de la enfermedad. En este caso los organismos resistentes escapan de la acción fungitóxica porque las membranas celulares no permiten la entrada del producto.
- **Rutas metabólicas alternas:** En este caso, el tóxico toma otra ruta en los individuos resistentes esquivando los sitios de acción del patógeno.
- **Conversión a un compuesto inactivo (detoxificación):** Ciertos patógenos tolerantes tienen la capacidad de convertir un fungicida específico en otra sustancia menos tóxica.
- **Compensación:** Es cuando un fungicida bloquea la producción de alguna enzima y esta es indispensable para la síntesis de algún compuesto vital en la vida del hongo; la producción de una mayor cantidad de enzima por parte del hongo, anula la acción del fungicida; haciendo resistente al patógeno.
- **Falta de activación del fungicida por el patógeno:** En ciertos casos algunos productos no son fungicidas en sí mismos, sino que deben sufrir un cambio o metabolización (activación) dentro del patógeno para convertirse en fungitóxicos; los fungicidas a los que el patógeno ha desarrollado resistencia no sufren esta activación dentro del patógeno y por tanto escapan a la acción del producto.
- **Alteración del sitio activo:** Cuando un fungicida es de acción específica en un solo sitio del patógeno, como es el caso del benomil que actúa sobre la tubulina del ADN; una modificación en este sitio puede traer como

consecuencia una falta de acople entre el patógeno y el fungicida y resultar en resistencia.

Dekker (1995), Georgopoulos (1995) y Brent (1995) presentaron las clases de resistencia siguientes:

**Resistencia discreta:** Se caracteriza por una repentina y marcada pérdida de efectividad y por la presencia de poblaciones sensibles y resistentes del patógeno, las cuales difieren ampliamente en su respuesta hacia el fungicida.

**Resistencia cuantitativa:** Se caracteriza por una pérdida lenta del control de la enfermedad y en la sensibilidad de la población del patógeno. A través de la disminución en el uso del fungicida y en la alternancia con fungicidas de diferente modo de acción. Esta resistencia puede ser revertida a poblaciones nuevamente sensibles.

**Resistencia cruzada:** Se presenta cuando las poblaciones de un patógeno en particular desarrolla resistencia a un fungicida y automática y simultáneamente se hace resistente a otros fungicidas que son afectados por la misma mutación y por el mismo mecanismo de resistencia.

**Resistencia múltiple:** Algunos patógenos pueden poseer mecanismos de resistencia separados a dos o más fungicidas no relacionados. Estos han surgido a partir de mutaciones independientes que fueron seleccionadas por exposición a cada uno de los fungicidas.

### **3.6. Sensibilidad y resistencia de *Colletotrichum* a fungicidas en México**

En México prácticamente no existen reportes o publicaciones que señalen la sensibilidad que guarda *Colletotrichum* a fungicidas. De acuerdo a Gutiérrez *et al* (2002) se evaluaron los fungicidas imazalil, procloraz y azoxystrobin para el

control de la antracnosis en frutos de mango (*C. gloesporioides*) cv. Haden, así como la sensibilidad que guardan diferentes aislamientos a las moléculas, esto en regiones productoras de Sinaloa, Guerrero, Michoacán y Chiapas, México. De acuerdo a los resultados obtenidos para el fungicida azoxystrobin, en todas las zonas productoras, en todos los aislamientos, la concentración efectiva 50 se ubicó entre las 0.000006 a 0.01ppm de ingrediente activo, lo cual señalan los autores como concentraciones bajas o sensibilidad alta.

### **3.7. Estudios de sensibilidad a fungicidas**

El primer paso para estudiar la resistencia a fungicidas es el monitoreo de esta en campo mediante el muestreo de poblaciones del patógeno para determinar su grado de sensibilidad a uno o más fungicidas. El primer punto consiste en realizar monitoreos al introducir al mercado de un nuevo fungicida y con esto obtener "líneas base" de sensibilidad del patógeno antes de que este sea expuesto al nuevo fungicida. Esta es la evaluación del rango "natural" de la sensibilidad y es empleado para la interpretación de cualquier monitoreo posterior en términos de pérdida de sensibilidad (Brent y Derek, 2007). Una segunda actividad es el monitoreo de la resistencia post-liberación comercial del fungicida, con el objetivo de vigilar la posible pérdida del grado de sensibilidad.

Las técnicas para monitorear la resistencia a fungicidas deben ser confiables y debe ser usadas en monitoreos posteriores para discernir lo menos posible en cuanto a la sensibilidad entre un monitoreo y otro. Es posible que ya existan métodos publicados por la FRAC (Fungicide Resistance Action Committee, por sus siglas en inglés), sin embargo, de no existir, se debe desarrollar una técnica *in vitro* o *in vivo*, la cual debe ser robusta, confiable y repetible; así como también que sea accesible en términos de tecnología disponible y que la sensibilidad obtenida esté relacionada con la observada en campo (Russell, 2003).

### 3.7.1. Ensayos de sensibilidad *in vitro*

Los ensayos *in vitro* pueden ser aplicados en cualquier tipo de patógeno obligado y no obligado, aunque hay mayores limitantes en los primeros, ya que los patógenos no obligados puede ser cultivados fácilmente en medio nutritivo. La mayoría de las técnicas involucran el uso de un medio sólido mezclado con fungicida donde se evalúa el crecimiento del hongo sobre la superficie. Debido a que los fungicidas son incorporados en el medio de cultivo estéril, se debe asegurar que el proceso de esterilización no afecta las propiedades del fungicida, así mismo se debe procurar no almacenarlo por largos periodos de tiempo (no más de 7 días) para evitar que se degrade o que el fungicida se sedimente y disminuya la concentración de este sobre la superficie (Russell, 2003).

Existen varias técnicas para evaluar la sensibilidad *in vitro* entre las que se incluyen la de inhibición del crecimiento micelial, ensayos de germinación de esporas y ensayos de elongación del tubo germinativo. La elección del medio de cultivo dependerá de las propiedades físico-químicas del fungicida principalmente su modo de acción fisiológico o bioquímico. Por ejemplo, un ensayo de germinación de esporas no podrá ser aplicado con un fungicida que no actúa en esta fase del ciclo biológico del hongo. Las condiciones específicas usadas en los ensayos de sensibilidad solamente podrán ser determinadas por experimentación, con la consigna de que sean repetitivas entre ellas (Russell, 2003).

Un factor importante que se debe considerar para la realización de ensayos de sensibilidad es el uso de aislamientos monospóricos, debido a la variabilidad genética que existe en la población del hongo en el campo. Evaluando varias esporas individuales de la misma lesión puede ser no representativo de la población del campo, mientras que evaluando esporas individuales de lesiones

diferentes se puede encontrar potencialmente más variabilidad genética (Russell, 2003).

### **3.7.2. Evaluación de los ensayos de sensibilidad *in vitro***

Para ensayos de sensibilidad basados en espora, se debe definir el criterio de cuando se considera germinada la espora y como evaluar la inhibición del crecimiento del tubo germinativo. Un criterio usado muy a menudo para considerar la espora germinada es si el tubo germinativo tiene al menos dos veces el diámetro de la espora. Si el ensayo está basado en el crecimiento micelial, se debe evaluar el crecimiento radial de la colonia en el medio de cultivo, el método más común involucra la evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento de micelio comparado con el crecimiento del hongo en ausencia de fungicida (testigo). Las medidas de crecimiento normalmente serán tomadas en dos diámetros de la colonia en ángulo recto. Si el inóculo es un trozo de micelio de una cepa sin tratar, deberá colocarse con la superficie de micelio hacia abajo para asegurar el contacto de este con el medio de cultivo con fungicida que se esté evaluando (Russell, 2003).

La sensibilidad del patógeno puede ser estimada con parámetros tales como:

- Dosis que brinda el control total del aislamiento (concentración mínima inhibitoria).
- Valores de  $DE_{50}$ , es decir la dosis que reduce en un 50% (o cualquier otro valor) el crecimiento de esporas o germinación de esporas comparado con un testigo en ausencia de fungicida.

Los valores de la concentración mínima efectiva son obtenidos directamente de las evaluaciones de las dosis. Los valores de  $EC_{50}$  pueden ser determinados de los datos de respuesta a las dosis mediante aproximación estadística (recomendado) o usando gráficos y estimando el 50 o 90% directamente. Cualquiera que sea el método usado se debe tener cuidado y asegurar que se

#### 4.2.1. Colecta de material vegetal en campo

Se colectaron frutos de fresa con síntomas de pudrición o manchado marrón en lesiones hundidas, frutos sanos o asintomáticos y también se colectaron otros órganos o partes de la planta como flores, hojas y estolones con las mismas características o lesiones típicas de estrangulamiento y manchado marrón (Figura 5). Las muestras se mantuvieron en refrigeración para su traslado y posterior proceso en el laboratorio. Se colectaron muestras de parcelas lejanas una de otra dentro de la misma zona para favorecer la variabilidad entre cepas, se tomaron datos de variedad y estructura colectada. El total de muestras se resume en el Cuadro 3.



**Figura 5.** Colecta de frutos con lesiones típicas de antracnosis

**Cuadro 3.** Aislamientos de *Colletotrichum acutatum* obtenidos, cultivar, estructura y origen de colecta.

| Núm. | Muestra | Zona de colecta | Órgano colectado | Cultivar    | Monospórico obtenido |
|------|---------|-----------------|------------------|-------------|----------------------|
| 1    | M1BII   | Maravatío       | Estolón          | Albion      | Ms38                 |
| 2    | M1BII   | Maravatío       | Estolón          | Albion      | Ms39                 |
| 3    | M1BII   | Maravatío       | Estolón          | Albion      | Ms40                 |
| 4    | M2A     | Maravatío       | Fruto            | Albion      | Ms1                  |
| 5    | M2A     | Maravatío       | Fruto            | Albion      | Ms2                  |
| 6    | M2A     | Maravatío       | Fruto            | Albion      | Ms3                  |
| 7    | M2A     | Maravatío       | Fruto            | Albion      | Ms36                 |
| 8    | M8A     | Maravatío       | Fruto            | Festival    | Ms15                 |
| 9    | M8A     | Maravatío       | Fruto            | Festival    | Ms34                 |
| 10   | M5AII   | Maravatío       | Estolón          | Camino real | Ms30                 |
| 11   | M5AII   | Maravatío       | Estolón          | Camino real | Ms31                 |

haga una estimación razonable; el uso de una  $DE_{50}$  estimada que se encuentre fuera del rango de dosis evaluadas ciertamente no es recomendado, particularmente cuando las dosis está en una escala logarítmica (Russell, 2003).

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Localización del sitio experimental**

Para elaborar el presente estudio se realizaron colectas de frutos enfermos y plantas completas de fresa de las dos zonas principales donde se cultiva fresa en el estado de Michoacán, estas son el Valle de Maravatío y el Valle de Zamora. La primer región presenta un clima templado con lluvias en verano, tiene una precipitación pluvial anual de 897.7 milímetros y temperaturas que oscilan de 14.1° a 29.9 °C, ubicado en las coordenadas 19°54' de latitud norte y 100°27' de longitud oeste, a una altura de 2,020 metros sobre el nivel del mar. Por su parte, en Zamora el clima es templado tropical con lluvias en verano, la precipitación pluvial anual promedio es de 1 000 milímetros, la temperatura oscila entre 6 y 39.2 grados centígrados, Zamora se localiza en las coordenadas 19°59' de latitud norte y 102°17' de longitud oeste a una altitud de 1560msnm<sup>8</sup>.

El ensayo de sensibilidad se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Centro Regional Universitario Centro-Occidente (CRUCO) de la Universidad Autónoma Chapingo, en Morelia, Michoacán y la identificación molecular del patógeno se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad (IREGEP) del Colegio de Posgraduados, en Montecillos, Estado de México.

### **4.2. Identificación morfológica y molecular de aislamientos**

Se llevó a cabo empleando cultivos monospóricos obtenidos de muestras del cultivo de fresa con síntomas característicos de antracnosis provenientes de las dos zonas de estudio.

---

<sup>8</sup> INEGI, 2010. Datos en línea. <http://www.inegi.org.mx/>.

|    |        |           |         |             |      |
|----|--------|-----------|---------|-------------|------|
| 12 | M5AII  | Maravatío | Estolón | Camino real | Ms32 |
| 13 | M5AII  | Maravatío | Estolón | Camino real | Ms33 |
| 14 | M5AI   | Maravatío | Fruto   | Albion      | Ms6  |
| 15 | M5AI   | Maravatío | Fruto   | Albion      | Ms7  |
| 16 | M5AI   | Maravatío | Fruto   | Albion      | Ms9  |
| 17 | M9B    | Maravatío | Fruto   | Festival    | Ms11 |
| 18 | M9B    | Maravatío | Fruto   | Festival    | Ms12 |
| 19 | M9B    | Maravatío | Fruto   | Festival    | Ms13 |
| 20 | M9B    | Maravatío | Fruto   | Festival    | Ms14 |
| 21 | M3BI   | Maravatío | Fruto   | Camino real | Ms16 |
| 22 | M3BI   | Maravatío | Fruto   | Camino real | Ms18 |
| 23 | M3BI   | Maravatío | Fruto   | Camino real | Ms28 |
| 24 | M1BIII | Maravatío | Hoja    | Albion      | Ms20 |
| 25 | M1BIII | Maravatío | Hoja    | Albion      | Ms21 |
| 26 | M1BIII | Maravatío | Hoja    | Albion      | Ms22 |
| 27 | M1BIII | Maravatío | Hoja    | Albion      | Ms23 |
| 28 | M2B    | Maravatío | Fruto   | Festival    | Ms25 |
| 29 | M2B    | Maravatío | Fruto   | Festival    | Ms26 |
| 30 | M2B    | Maravatío | Fruto   | Festival    | Ms27 |
| 31 | Z3     | Zamora    | Fruto   | Camino real | Ms41 |
| 32 | Z8B    | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms44 |
| 33 | Z8B    | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms45 |
| 34 | Z8B    | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms46 |
| 35 | Z12B   | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms47 |
| 36 | Z12B   | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms48 |
| 37 | Z12B   | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms49 |
| 38 | Z13B   | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms51 |
| 39 | Z14C   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms53 |
| 40 | Z14C   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms54 |
| 41 | Z14C   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms55 |
| 42 | Z13A   | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms57 |
| 43 | Z13A   | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms58 |
| 44 | Z14B   | Zamora    | Fruto   | Tioga       | Ms59 |
| 45 | Z14B   | Zamora    | Fruto   | Tioga       | Ms60 |
| 46 | Z14B   | Zamora    | Fruto   | Tioga       | Ms61 |
| 47 | Z8A    | Zamora    | Fruto   | Camino real | Ms63 |
| 48 | Z8A    | Zamora    | Fruto   | Camino real | Ms64 |
| 49 | Z8A    | Zamora    | Fruto   | Camino real | Ms65 |
| 50 | Z4B    | Zamora    | Fruto   | Camino real | Ms66 |
| 51 | Z4B    | Zamora    | Fruto   | Camino real | Ms67 |
| 52 | Z4B    | Zamora    | Fruto   | Camino real | Ms70 |
| 53 | Z14A   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms71 |
| 54 | Z14A   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms72 |
| 55 | Z14A   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms73 |
| 56 | Z14A   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms74 |
| 57 | Z14A   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms75 |
| 58 | Z14A   | Zamora    | Fruto   | Festival    | Ms76 |
| 59 | Z1     | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms77 |
| 60 | Z1     | Zamora    | Fruto   | Albion      | Ms79 |

#### **4.2.2. Manejo de muestras para obtención de cepas monospóricas**

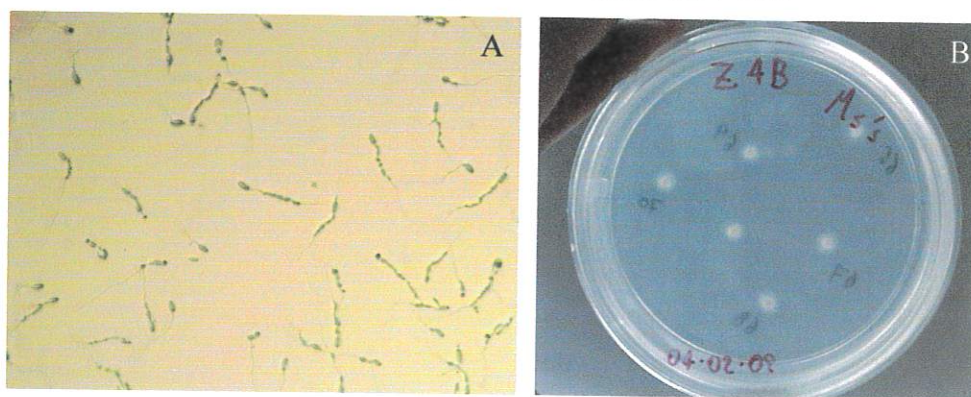
Todo el material de laboratorio utilizado (cajas petri, pipetas, pinzas, navajas, etc.) se esterilizó previamente, mediante autoclave a 120°C por 15 minutos o bien sumergiendo durante un minuto o más en alcohol etílico al 95%.

El procesamiento de muestras fue realizando un lavado y desinfectado previo, con el fin de eliminar los contaminantes superficiales que pudieran interferir con el aislamiento del patógeno, empleando una solución de hipoclorito de sodio al 3 o 10% y agua destilada estéril para lavado y enjuague. A continuación se cortaron trozos de tejido sano-enfermo para su siembra en medio de cultivo. Se empleó el medio de cultivo PDA (Difco, Becton, Dickinson and Company. Sparks, MD 21152, USA) esterilizado en autoclave siguiendo las instrucciones de la etiqueta para la preparación del medio.

Las cajas petri, con las muestras vegetales se sellaron con parafilm para evitar contaminación y se incubaron a temperatura ambiente por 5 días para posteriormente realizar un reaislamiento o purificación de colonias (una por sitio de colecta). Una vez obtenidos dichos aislamientos, se conservaron en cajas petri de 9 cm de diámetro a temperatura a 4°C. A partir de los aislamientos purificados se obtuvieron 30 cultivos monospóricos por zona (aproximadamente 3 por sitio de colecta), de tal forma que la muestra fuera representativa y se ajustara a los estándares de evaluación.

El procedimiento general de obtención de cepas monospóricas fue mediante la siembra de una suspensión de conidios, extraída de una colonia madura (10 días de edad) a una concentración de  $10^3$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  ajustada con un hemocitómetro y para favorecer la separación de conidios se agregó una gota de Tween 20. Los conidios se colocaron en medio de cultivo agua agar y se incubaron por 10 a 18 h a temperatura ambiente. Posteriormente con la ayuda

de una aguja de disección se seleccionaron conidios individuales seleccionando aquellos que mostraron una longitud de tubo germinativo 2-3 veces mayor que la longitud del conidio (Figura 6 A). Todo este proceso se realizó empleando un microscopio de disección a 40X. Los conidios seleccionados se pasaron a cajas con medio PDA y se incubaron a temperatura del laboratorio (Figura 6 B). Estas colonias puras se conservaron en refrigeración a 4°C para ser usados en las pruebas morfológicas, moleculares y de sensibilidad a los fungicidas. También para efectos de conservación se realizaron transferencias cada 15 días a cajas nuevas, tomando un rodete de 5mm y sembrándolo en PDA.



**Figura 6. A.** Selección de conidios individuales germinados, **B.** Crecimiento de cultivos monospóricos en medio nutritivo PDA.

#### **4.2.3. Extracción y amplificación de DNA del hongo**

Se tomó un solo cultivo monoconidial de cada sitio, es decir, se secuenció un número de cepas igual al número de muestras de campo. La extracción de DNA se realizó en el laboratorio de Biotecnología de semillas del Colegio de Postgraduados, de acuerdo a los protocolos descritos en anexo 1. Una vez obtenido el DNA se procedió a realizar la amplificación por PCR de la región ITS 4 e ITS 5 de DNA ribosomal. Posteriormente, se realizó la limpieza de los productos de PCR con el kit de purificación QIAquick (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para posteriormente enviarse a secuencia a la compañía Macrogen, USA. Finalmente, las secuencias recibidas en archivo electrónico, se editaron, se obtuvieron secuencias consenso y se compararon con secuencias almacenadas en el Banco de genes

del GenBank en el NCBI en línea a través del programa BLAST y se buscaron las homologías del orden del 100 % de similitud o ligeramente inferior, para llegar a la especie exacta del microorganismo analizado.

#### **4.2.3.1. Extracción de DNA por método rápido**

Este procedimiento de extracción de DNA fue descrito por Silva-Rojas (2007)<sup>9</sup> y se aplicó a las cepas puras monospóricas. El procedimiento se describe a detalle en el Anexo 1.

#### **4.2.3.2. Extracción de DNA método de Sambrook (1986) y Bainbridge *et al*, 1990 modificado por Cámara (2001), para bacterias y hongos**

De la misma manera que para el método rápido, la extracción de DNA mediante el método convencional de Sambrook y Bainbridge, se llevó a cabo a partir de cepas puras y el procedimiento se describe a detalle en Anexo 1.

Se recomienda evaluar la presencia y calidad del DNA extraído, mediante una prueba de electroforesis en un gel de agarosa (Anexo 1), teñido con bromuro de etidio, antes de realizar la amplificación.

#### **4.2.4. Manejo de secuencias de DNA**

El producto obtenido de la extracción de DNA se llevó a amplificación mediante la aplicación del siguiente programa específico en termociclador FPROGO2Y (Techne Progene®): 95 °C por 4 min un solo ciclo, 95° por 2 min un ciclo, 55 °C por 1 min un ciclo, 72 °C por 2 min 35 ciclos y finalmente el 72 °C por 2 min un solo ciclo.

---

<sup>9</sup> No publicado, patente en trámite. Dra. Hilda Silva Rojas, responsable del laboratorio de biotecnología de semillas, programa de Maestría en Tecnología de semillas, Colegio de Posgraduados, campus montecillos, Méx.

Una vez que se terminan de correr los programas se recuperaron los tubos para realizar una electroforesis en gel de agarosa para comprobar la presencia de la secuencia o cadenas de los ácidos nucleicos deseados y realizar la limpieza para su secuenciación.

Una vez que se obtuvo la fotografía en fotodocumentador y se corroboró la presencia de una sola banda de DNA, correspondiente a la muestra deseada, se enviaron las muestras a secuenciar a la compañía MACROGEN®, con sede en Estados Unidos.

#### **4.2.5. Identificación morfológica de aislamientos**

Una vez maduros los aislamientos, se identificó el patógeno mediante la apariencia y color de las colonias, así como también la morfología de conidios. Para ello se prepararon suspensiones de conidios en agua estéril, de cada cepa monospórica y se colocó una gota en un portaobjetos para observarlos con microscopio compuesto (40X). Se utilizó una cámara fotográfica profesional montada y se realizaron medidas de 30 conidios por cepa mediante el software Motic Image Plus (Motic China Group CO, LTD) y el promedio de las mediciones se comparó con lo reportado por Peres *et al* (2005) y Farrera *et al.*, (2007).

#### **4.3. Determinación de la sensibilidad a fungicidas**

Para el desarrollo de esta fase se emplearon los mismos cultivos monospóricos y las mismas muestras vegetales, que para la caracterización molecular, es decir, los aislamientos de hongo usados fueron copias o repeticiones de las cepas antes listadas. En esta etapa se evaluaron dos parámetros: inhibición del crecimiento micelial e inhibición de la germinación de esporas; para todos los productos, sin importar el modo y sitio de acción del fungicida.

#### 4.3.1. Fungicidas

Se evaluaron 2 fungicidas de diferente grupo químico. El **tiofanato metílico** es un fungicida del grupo químico bencimidazoles. Actúa principalmente como un inhibidor de la polimerización de la  $\beta$ -tubulina en muchas especies de hongos. Se evaluó la marca comercial **Cercobin M®**, (BASF Mexicana, Zapopan, Jalisco), el cual viene formulado al 70% en forma de Polvo Humectable.

El **azoxystrobin** es un fungicida de amplio espectro del grupo químico inhibidores externos de la quinona (Qol) con propiedades profilácticas y curativas. El modo de acción es inhibiendo la respiración de los hongos a nivel de mitocondrias. Se evaluó la marca comercial **Amistar®**, (Syngenta Agro S.A de C.V. México, D.F.), el cual viene formulado al 50% en forma de gránulos solubles (FRAC, 2008).

#### 4.3.2. Preparación de soluciones madre y medio de cultivo adicionado

Se prepararon soluciones madre de cada uno de los fungicidas, en base a ingrediente activo. De esta forma, para preparar una solución madre de 1000 ppm de azoxystrobin, se pesaron 2g de producto comercial (concentrado al 50%) y se diluyeron en 1 L de agua destilada estéril y de la misma manera se hizo con el tiofanato metílico guardando las debidas concentraciones. A partir de esta solución concentrada se hicieron diluciones seriales 1:10 para obtener las concentraciones deseadas usando pipetas desechables de 10 ml y micropipetas de 100  $\mu$ L para los volúmenes pequeños (Figura 7).



**Figura 7.** Solución madre y medio nutritivo adicionado con fungicida.

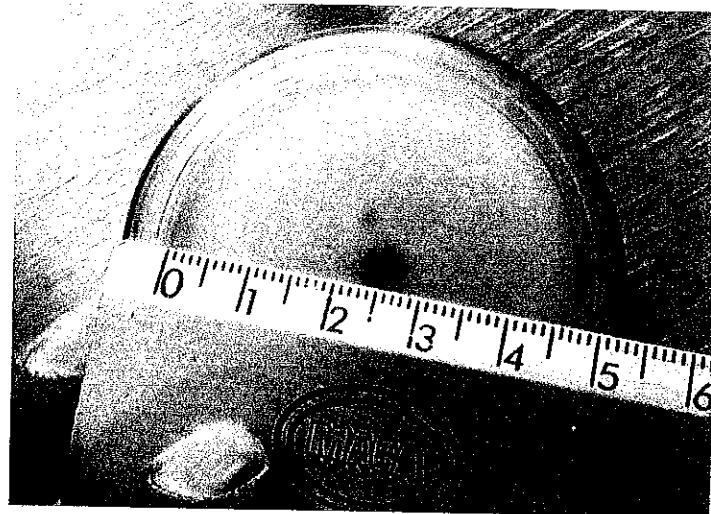
El medio de cultivo fue PDA adicionado con la concentración correspondiente del fungicida. La solución con la concentración correspondiente de fungicida se adicionó al medio cuando este se enfrió a una temperatura entre 60 y 50 °C, agitando constantemente para un buen homogenizado, y se vació inmediatamente en las cajas petri.

#### **4.3.3. Ensayo de crecimiento micelial**

Se evaluaron 6 dosis de cada fungicida a saber: 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001  $\mu\text{g/ml}$  para azoxystrobin y 1000, 100, 10, 1, 0.1 y 0.01  $\mu\text{g/ml}$  para tiofanato metílico, más un testigo absoluto al que no se le agregó fungicida (0 ppm).

Se realizó el procedimiento descrito por (Rebollar *et al.*, 2007). Del margen de colonias activas de cada uno de los aislamientos monospóricos se sacaron discos de 0.5 cm de diámetro y se colocaron en el centro de cajas petri con

medio de cultivo adicionado con el fungicida. Se realizaron 3 repeticiones (cajas) de cada dosis. Las cajas fueron selladas con parafilm y colocadas en bolsas plásticas estériles e incubadas en obscuridad a temperatura del laboratorio ( $20\pm4^{\circ}\text{C}$ ) por un período de 5 días. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro de las colonias como se observa en la Figura 8 (dos mediciones en ángulo recto una de otra) y el promedio de estas mediciones se utilizó para el análisis. El crecimiento de micelio en las 3 repeticiones fue promediado y usado para calcular el crecimiento relativo en relación al promedio de crecimiento micelial en el testigo absoluto para cada una de las concentraciones en cada uno de los aislamientos monospóricos. El crecimiento relativo de micelio fue utilizado para estimar la  $DE_{50}$  (Dosis que reduce en un 50% el crecimiento de micelio) mediante la aplicación del modelo log-logístico.



**Figura 8.** Medición del diámetro de colonia

#### **4.3.4. Ensayo de germinación de conidios**

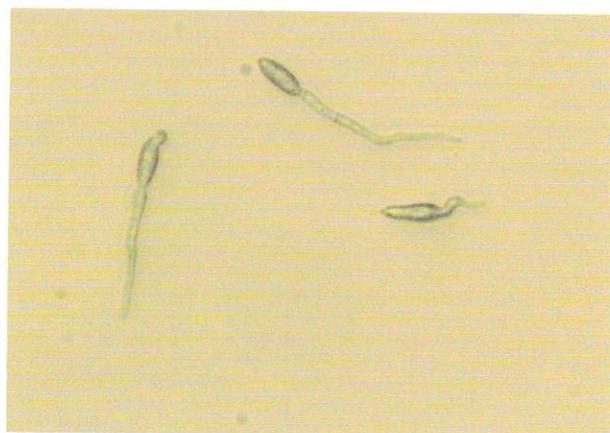
Al igual que para el caso del crecimiento micelial, para esta variable también se evaluarán las 6 dosis de cada fungicida, más un testigo absoluto al que no se le agregará fungicida al medio (0 ppm). Así mismo se consideraron tres repeticiones para cada dosis. Con ayuda de un asa bacteriológica se tomaron conidios de los cultivos monospóricos. Estas muestras se tomaron de la parte donde se observaba esporulación madura dentro de la colonia y se transfirieron

a tubos con agua estéril. Se agitaron por 5 segundos en Vortex para homogenizar la solución. Posteriormente se determinó la concentración con ayuda de un hematocitómetro y se diluyó cuando hubo necesidad de tal forma que se obtuvieron concentraciones finales de  $10^3$  a  $10^4$  conidios \*  $\text{ml}^{-1}$ .

Se utilizaron cajas petri de 6 cm de diámetro con medio de cultivo agua-agar adicionado con fungicida, como superficie de germinación, preparado de la misma forma que en la fase de inhibición de crecimiento micelial, es decir, a partir de la solución madre de fungicida, se hicieron diluciones para obtener las concentraciones deseadas y se adicionó el medio antes de que solidificara.

De la suspensión de conidios previamente preparada se tomó una alícuota y se agregó a las cajas petri con el medio Agua Agar + fungicida y se dejó incubar por 20 horas a temperatura ambiente bajo oscuridad. Transcurrido este tiempo se procedió a la evaluación.

La evaluación se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico u óptico 40X. Se observó la superficie del medio de cultivo y se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados para cada dosis de fungicida en cada una de las repeticiones. Para homogeneizar la evaluación se tomó como base 100 conidios. El criterio de decisión para conidio germinado fue en base a la longitud del tubo germinativo, de tal forma que este fuera mayor de 5 veces al diámetro o tamaño del conidio (Figura 9). Con estos datos se construyeron tablas de promedios que se graficaron y se analizaron estadísticamente.



**Figura 9.** Conidio germinado con tubo germinativo proyectado normalmente.

#### 4.3.5. Análisis de datos

A partir de los datos obtenidos (crecimiento micelial y germinación de conidios) se calculó el crecimiento relativo de micelio y germinación relativa de conidios mediante la comparación en ambos casos contra el testigo sin aplicación de fungicida. Con estos valores mediante la aplicación del modelo log-logístico se estimó la EC<sub>50</sub> y a partir de estos parámetros se construyó la distribución de la sensibilidad de *Colletotrichum acutatum* en las dos regiones y para cada uno de los fungicidas y se hicieron las comparaciones de interés.

##### 4.3.5.1. Estimación de concentraciones efectivas 50 (CE<sub>50</sub>)

La EC<sub>50</sub> del crecimiento relativo de micelio o germinación relativa de conidios fue estimada mediante la adecuación del modelo log-logístico con asíntota superior usando el procedimiento de SAS NLMIXED (versión 9.1). El modelo es expresado como:

$$y = \frac{\alpha}{1 + \exp\left(\beta \log\left(\frac{\text{dosis}}{\text{DE}_{50}}\right)\right)}$$

Donde  $y$  es el crecimiento relativo de micelio o la germinación relativa de conidios,  $\alpha$  la asíntota superior (máximo valor posible de  $y$ ),  $\beta$  es la pendiente

en el punto de inflexión y  $DE_{50}$  es la dosis a la cual el crecimiento/germinación es reducido en 50% (Rebollar *et al*, 2007).

El modelo es una reparametrización del modelo log-logístico en términos de la  $DE_{50}$ . Los valores de inicio de los parámetros para las interacciones fueron asignados arbitrariamente. Debido a que no todos los valores de inicio resultaron en la convergencia para todos los aislamientos, diferentes conjuntos de valores de inicio fueron usados para alcanzar la convergencia. La calidad del ajuste fue comprobada revisando el patrón de residuales para cada uno de los aislamientos (Rebollar *et al*, 2007).

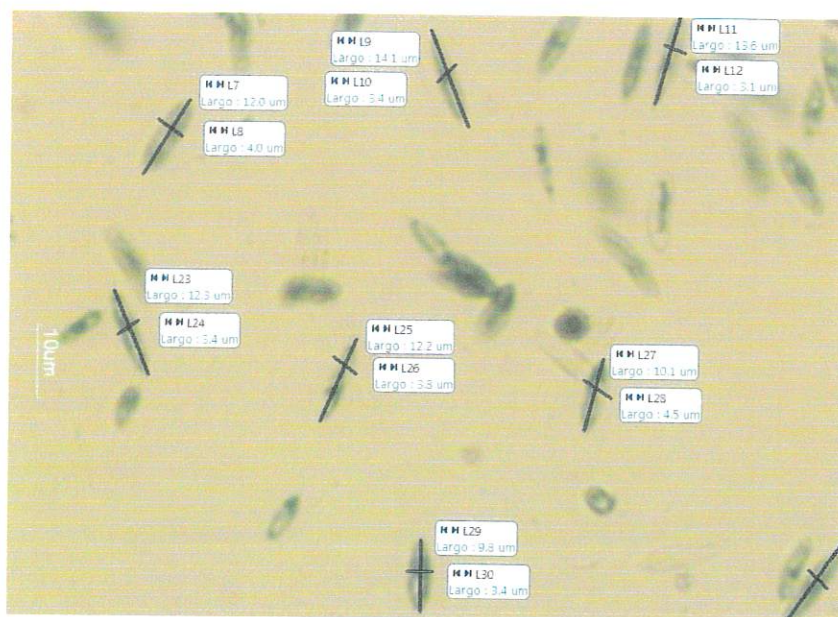
#### **4.3.5.2. Distribución de la sensibilidad**

Se utilizaron histogramas para ilustrar la distribución de los valores  $DE_{50}$  para el crecimiento de micelio y germinación de conidios. El momento estimado, mediciones de dispersión de estadística básica y parámetros de sesgo o desalineado, pruebas de normalidad se obtuvieron con la ayuda del Proc Univariate de SAS. La elaboración de los histogramas de distribución de la sensibilidad se realizó con ayuda del software SigmaPlot (versión 10.0).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1. Identificación morfológica de aislamientos

Todos los aislamientos del patógeno asociado a los frutos con antracnosis obtenidos de las dos regiones productoras de fresa en Michoacán (Valle de Zamora y Maravatío) correspondieron a *Colletotrichum acutatum*. Los aislamientos, se caracterizaron por la formación de colonias de color blanco, con el centro gris oscuro, donde se destaca la presencia de coloraciones anaranjadas concéntricas tanto en el centro como en las márgenes. Conidios lisos, unicelulares, aseptados, fusiformes y de aproximadamente 10-14 x 4-6µm Figura 10.



**Figura 10.** Morfología típica de conidios de *Colletotrichum acutatum*

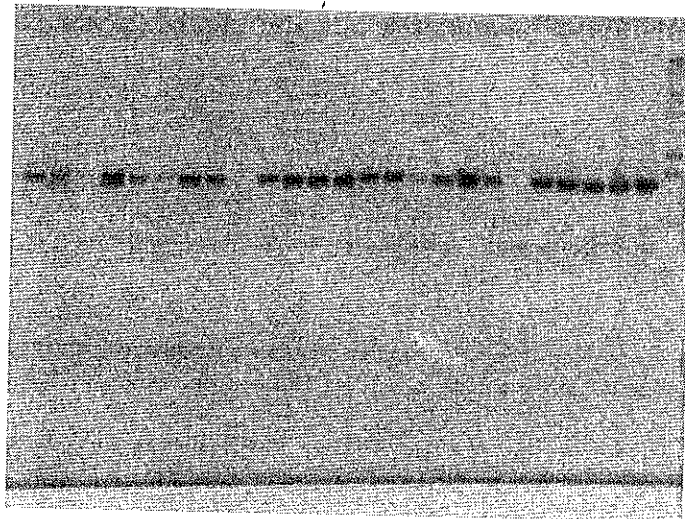
Estos datos coinciden con los señalados por Farrera *et al.* (2007), quienes señalan que *C. acutatum* se caracteriza por la formación de colonias de color blanco con el centro gris oscuro, donde se destaca la presencia de coloraciones anaranjadas concéntricas tanto en el centro como en los márgenes. Los

conidios son lisos, unicelulares (sin septas), fusiformes los cuales corresponden a la especie *Colletotrichum acutatum*.

Sin embargo, debido a la influencia del ambiente sobre la estabilidad morfológica y la existencia de formas intermedias, este criterio no es siempre adecuado para una diferenciación confiable de especies de *Colletotrichum*, más aun si consideramos que en la antracnosis de la fresa pueden estar relacionada con otras especies como *C. fragarie* y *C. gloeosporioides*. Un método paralelo para la identificación de especies es usar las técnicas moleculares (Villanueva *et al.*, 2005).

## 5.2. Identificación molecular de aislamientos

Todos los aislamientos obtenidos de lesiones típicas de antracnosis en los diferentes órganos de fresa, se identificaron como *Glomerella acutata* (anamorfo: *Colletotrichum acutatum*). Las secuencias obtenidas producto de la amplificación por PCR de la región ITS 4 e ITS 5 del DNA ribosomal (Figura 11) de los 20 aislamientos fueron 99% homólogas a las accesiones AM991131 y AY266405 depositadas en el GenBank del NCBI (Cuadro 4). La comparación fue realizada con el programa BLAST.



**Figura 11.** Electroforesis de producto de la amplificación por PCR de la región ITS 4 e ITS 5 del DNA ribosomal.

Estos resultados se compararon con lo obtenido por Freeman *et al.* (1998) quienes identificaron molecularmente al agente causal de la pudrición de frutos de fresa con síntomas típicos de antracnosis, de acuerdo a lo reportado, lograron caracterizar y relacionar en un cien por ciento de similitud sus cepas con aislamientos almacenados en bases de datos correspondientes a *C. acutatum*.

**Cuadro 4.** Homologías obtenidas entre secuencias amplificadas y accesiones depositadas en GenBank del NCBI mediante BLAST.

| Aislamiento | Identidad                                                                | Taxonomía                                                                                                                      | Accesión GenBank mas similar | % de similitud |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------|
| M1BII       | <i>Glomerella acutata</i><br>(anamorfo: <i>Colletotrichum acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131                     | 99             |
| M2A         | <i>Glomerella acutata</i><br>(anamorfo: <i>Colletotrichum acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405                     | 99             |
| M8A         | <i>Glomerella acutata</i><br>(anamorfo: <i>Colletotrichum acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405                     | 99             |
| M5AII       | <i>Glomerella acutata</i><br>(anamorfo: <i>Colletotrichum acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405                     | 99             |
| M5AI        | <i>Glomerella acutata</i><br>(anamorfo: <i>Colletotrichum acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405                     | 99             |
| M9B         | <i>Glomerella acutata</i><br>(anamorfo: <i>Colletotrichum acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131                     | 99             |
| M3BI        | <i>Glomerella acutata</i><br>(anamorfo: <i>Colletotrichum acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131                     | 99             |
| M1BIII      | <i>Glomerella</i>                                                        | Eukaryota; Fungi; Dikarya;                                                                                                     | AM991131                     | 99             |

|      |                                                                                                 |                                                                                                                                            |          |    |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----|
|      | <i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> )                      | Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> .                               |          |    |
| M2B  | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131 | 99 |
| Z3   | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131 | 99 |
| Z8B  | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131 | 99 |
| Z12B | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131 | 99 |
| Z13B | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405 | 99 |
| Z14C | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405 | 99 |
| Z13A | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131 | 99 |
| Z14B | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405 | 99 |
| Z8A  | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405 | 99 |
| Z4B  | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AY266405 | 99 |
| Z14A | <i>Glomerella</i>                                                                               | Eukaryota; Fungi; Dikarya;                                                                                                                 | AY266405 | 99 |

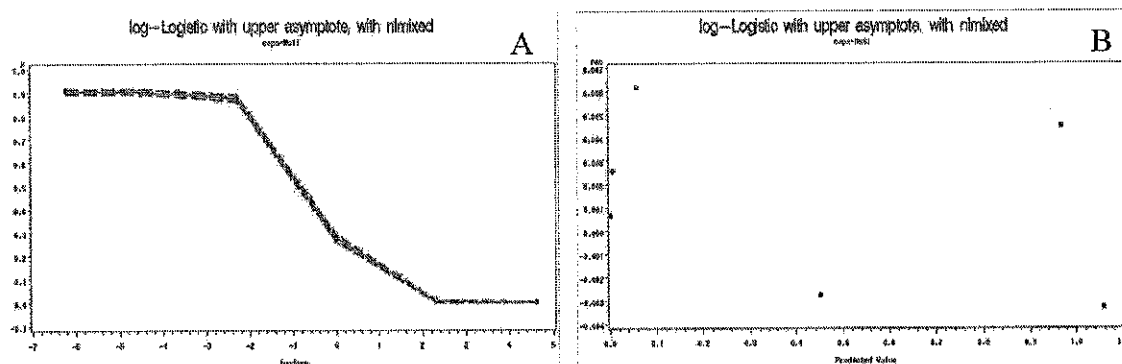
|    |                                                                                                 |                                                                                                                                            |          |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----|
|    | <i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> )                      | Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> .                               |          |    |
| Z1 | <i>Glomerella</i><br><i>acutata</i><br>(anamorfo:<br><i>Colletotrichum</i><br><i>acutatum</i> ) | Eukaryota; Fungi; Dikarya;<br>Ascomycota; Pezizomycotina;<br>Sordariomycetes;<br>Hypocreomycetidae;<br>Glomerellaceae; <i>Glomerella</i> . | AM991131 | 99 |

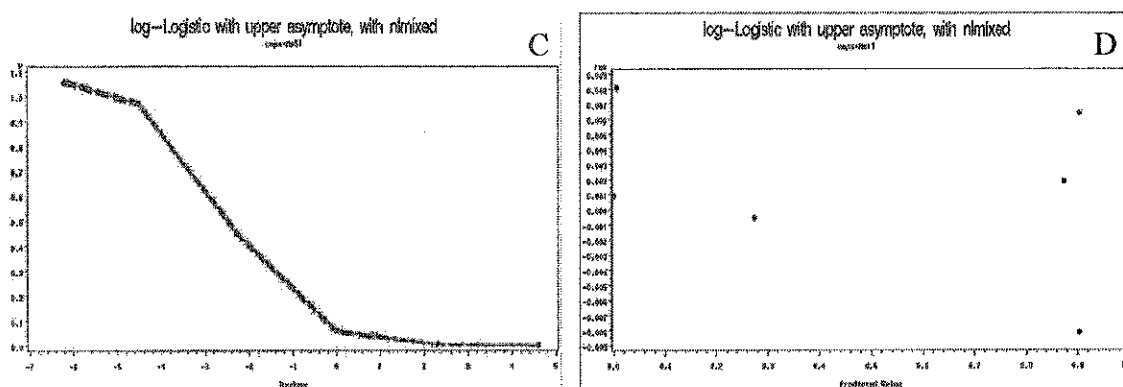
### 5.3. Ajuste del modelo estadístico

El modelo de predicción log-logístico  $y = \frac{55}{(1 + \exp(\beta \log(\frac{\text{dose}}{DE_{50}})))}$  con asíntota superior

fue adecuado para describir el crecimiento relativo del micelio y la germinación relativa de conidios a diferentes dosis de fungicidas sin embargo no se pudo emplear para describir y predecir la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) del crecimiento micelial de todas las cepas evaluadas con el fungicida tiofanato metílico. En este caso se empleó la fórmula de regresión lineal  $y = \beta_0 + \beta_1 x$  y se empleó la parte recta de la curva para el análisis.

Para cada uno de los aislamientos evaluados se estimó la concentración efectiva que inhibió el 50% del crecimiento micelial o germinación de conidios (DE<sub>50</sub>) y se corroboró que la distribución de residuales tuviera un patrón aleatorio (Figura 12).





**Figura 12.** Curva respuesta típica de valores para la dosis efectiva predicha en aislamientos de *Colletotrichum acutatum* expuestos a azoxystrobin *in vitro*; A) Crecimiento relativo de micelio y B) sus residuales asociados; C) germinación relativa de conidios y D) sus residuales asociados.

El modelo log-logístico empleado, ajustó perfectamente para estimar los datos de  $CE_{50}$  debido a que los valores obtenidos, tal como lo señala Russell, (2003) son razonables ya que se encuentran similares al rango de dosis reportadas y por lo mismo es recomendable, particularmente porque las dosis están en una escala logarítmica.

#### 5.4. Distribución de la sensibilidad de cepas de *Colletotrichum acutatum* al tiofanato metil

La sensibilidad de las cepas de *C. acutatum* al tiofanato metílico, en etapa de micelio varió entre una dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) de 0.28 a 9.72  $\mu\text{g/ml}$ , con una mediana de 2.39  $\mu\text{g/ml}$  para el Valle de Maravatío, ajustándose a una distribución normal cuando se realizó la transformación de los datos al logaritmo base 10. Por su parte la distribución de la sensibilidad en Zamora se ajustó a una distribución normal y no requirió del uso de ningún tipo de transformación (Figura 13) con valores que variaron desde 1.39 a 2.99  $\mu\text{g/ml}$ , con una media y mediana muy similar a la obtenida en Maravatío. En el caso de conidios, las  $DE_{50}$  presentaron una distribución amplia desde 0.9 a 396.4  $\mu\text{g/ml}$  con una mediana de 20.9  $\mu\text{g/ml}$  para el Valle de Maravatío, mientras que para el Valle de Zamora se obtuvieron valores más bajos variando desde 0.43 a 63.32  $\mu\text{g/ml}$

con una media 10.9 y una mediana de 5.0  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 14). Resulta notorio que en general, no existen diferencias significativas entre las distribuciones de la sensibilidad en ambos valles para el caso de micelio, pero si para el caso de los conidios (Cuadro 5). Sin embargo, considerando el modo de acción del tiofanato metílico, el crecimiento micelial refleja con mayor precisión la sensibilidad de los aislamientos. Sin embargo resulta interesante notar que los valores de sensibilidad de conidios del Valle de Maravatío fueron en general mayores a los valores de la  $DE_{50}$  obtenidos para el Valle de Zamora.

**Cuadro 5.** Estadística básica y momentos de los valores de  $DE_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) en micelio y conidios de *C. acutatum* obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora para el fungicida tiofanato metílico, 2009.

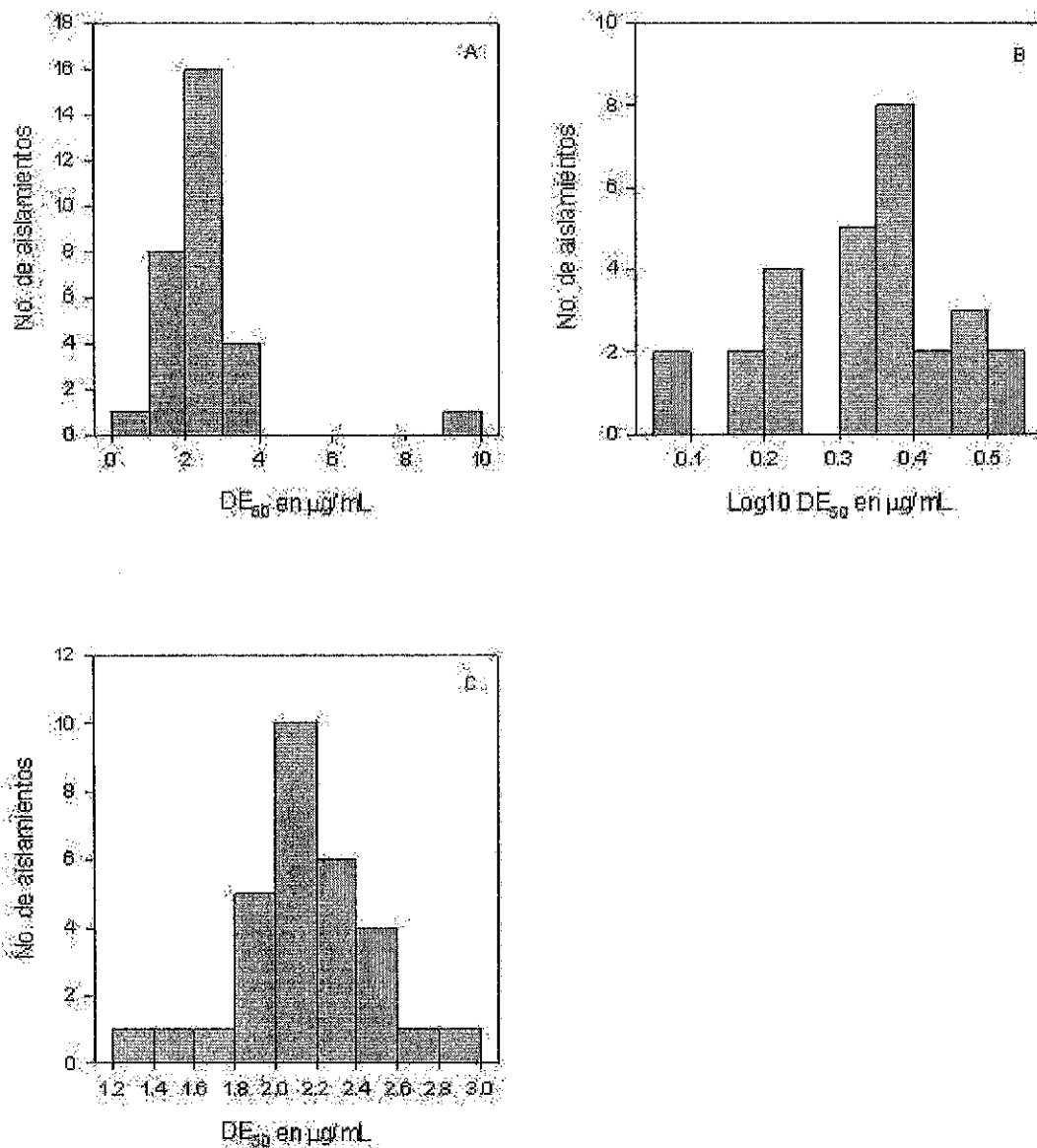
| Variable | Origen       | Media | DS    | Mínimo | Máximo | Mediana | Rango | Skewness | Kurtosis |
|----------|--------------|-------|-------|--------|--------|---------|-------|----------|----------|
| Micelio  | V. Maravatío | 2.46  | 1.52  | 0.28   | 9.72   | 2.39    | 9.42  | 3.78     | 18.36    |
|          | V. Zamora    | 2.17  | 0.32  | 1.39   | 2.99   | 2.16    | 1.59  | -0.11    | 0.97     |
| Conidios | V. Maravatío | 50.4  | 84.2  | 0.9    | 396.4  | 20.9    | 395.5 | 3.1      | 10.31    |
|          | V. Zamora    | 10.94 | 15.17 | 0.43   | 63.75  | 5.0     | 63.32 | 2.28     | 5.21     |

Estos resultados, son similares a los reportados por Chung *et al* (2006), donde cinco aislamientos de *C. gloesporioides* presentaron valores superiores a 100  $\text{mg/l}$  de tiofanato metílico y se agruparon como altamente resistentes, mientras que tres aislamientos presentaron valores de  $DE_{50}$  entre 10 y 100 $\text{mg/l}$  y se clasificaron como medianamente resistentes y 21 aislamientos que presentaron valores  $DE_{50}$  menores a 1 $\text{mg/l}$  se clasificaron como sensibles. Por otro lado, los aislamientos de *C. acutatum* fueron inherentemente menos sensibles a tres fungicidas, cuyos valores de  $DE_{50}$ , excluyendo un aislamiento se encontraron entre 1 a 10 $\text{mg/l}$  de tiofanato metílico, mas de 100 $\text{mg/l}$  para dietofencarb y entre 100 a 1000 $\text{mg/l}$  de iminoactadina. Los resultados obtenidos en este estudio no superaron los 3  $\mu\text{g/ml}$ , por lo que podrían considerarse que las poblaciones de *C. acutatum* de ambas zonas de estudio aún manifiestan una sensibilidad moderada a los bencimidazoles como el tiofanato metílico. Sin embargo es necesario considerar con mayor cuidado a la germinación de conidios, pues en

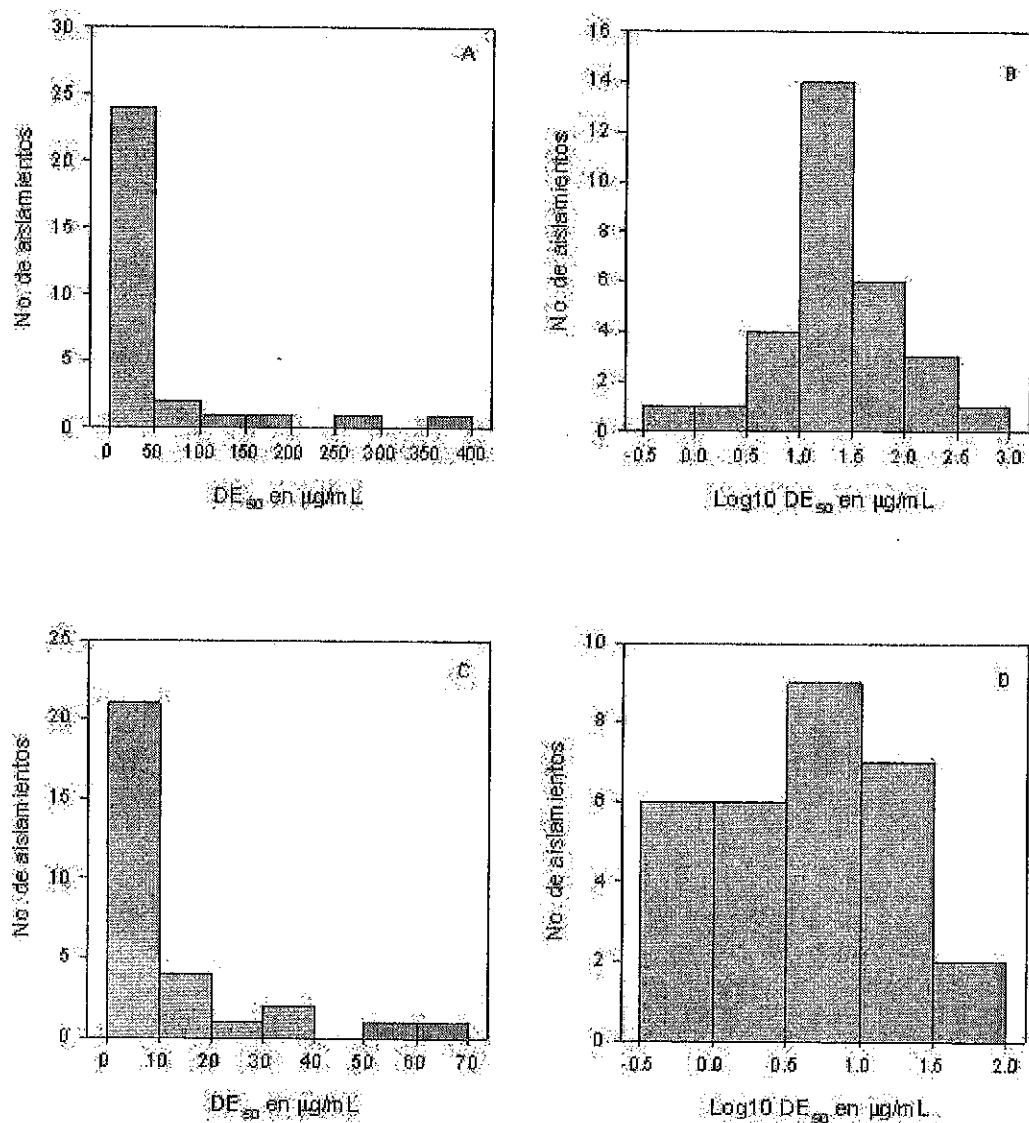
el Valle de Maravatío se encontraron aislamientos con  $DE_{50}$  superiores a 396  $\mu\text{g/ml}$ .

Por otro lado, los fungicidas bencimidazoles relacionados como el benomilo, presentan resultados que pueden estar relacionados a la sensibilidad al tiofanato metílico, por tal motivo podemos comparar los resultados obtenidos por Peres *et al.* (2004), quienes mencionan que los aislamientos de *C. gloesporioides* resultaron ser tanto altamente susceptibles como resistentes al benomilo, a diferencia de los aislamientos de *C. acutatum* que resultaron ser moderadamente resistentes sin distinción entre ellos. Los aislamientos de *C. gloesporioides* considerados susceptibles fueron inhibidos a una concentración de 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que los considerados resistentes crecieron sin problemas a 10  $\mu\text{g/ml}$ . El 55% del desarrollo del hongo *C. acutatum* fue inhibido a 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . La germinación de esporas de *C. acutatum* fue inhibida mas a 0.1  $\mu\text{g/ml}$  que a 1.0  $\mu\text{g/ml}$  o una concentraciones más altas de benomilo.

De acuerdo a Wong *et al.*, (2008) los valores de la dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) para *Colletotrichum cereale* al tiofanato metílico variaron de 0.14 a 2.3  $\mu\text{g/ml}$  con una media de 0.75  $\mu\text{g/ml}$  en sesenta aislamientos provenientes de pastos en California que no han sido expuestos a fungicidas. Sin embargo en sesenta aislamientos expuestos evaluados solamente tres fueron sensibles al tiofanato metílico a una concentración superior a 30  $\mu\text{g/ml}$ , a su vez, los aislamientos no sensibles también fueron insensibles al benomilo *in vitro*. De la misma manera dos aislamientos insensibles al benomilo o al tiofanato metílico no se controlaron *in vivo* con cualquiera de estos fungicidas en plantas tratadas preventivamente a una dosis de 11  $\mu\text{g/ml}$ , lo cual confirmó los resultados de la prueba *in vitro*. De un total de 361 aislamientos, de 6 localidades distintas de California, más del 90% se mostraron resistentes al tiofanato metílico empleando como dosis discriminatória 10  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura. 13.** Distribución de la sensibilidad de cepas de *C. acutatum* con base en la sensibilidad de micelio a tiofanato metílico: A) Distribución original de los valores de concentración efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) en aislamientos obtenidos del Valle de Maravatío, Mich.; B) Logaritmo base 10 de los valores de  $DE_{50}$  en A; C) Distribución original de la sensibilidad de aislamientos obtenidos del Valle de Zamora, Mich.



**Figura. 14.** Distribución de cepas en base a la sensibilidad de conidios de aislamientos de *C. acutatum* a tiofanato metílico: A) Distribución original de los valores de concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) en aislamientos obtenidos del Valle de Maravatío, Mich.; B) Logaritmo base 10 de los valores de CE<sub>50</sub> en A; C) Distribución de la CE<sub>50</sub> en aislamientos obtenidos del Valle de Zamora, Mich.; D) Logaritmo base 10 de los valores de CE<sub>50</sub> en C.

#### 5.4.3. Relación de la sensibilidad de conidios y micelio al tiofanato metílico

Con el fin de determinar si existía una relación entre la sensibilidad micelio con la sensibilidad de conidios en ambas zonas de estudio, el análisis de correlación de Pearson, mostró que tanto en Maravatío ( $r=0.11$ ;  $P=0.31$ ) como en Zamora ( $r= 0.118$ ;  $P= 0.403$ ) no existen una correlación significativa entre ambas estructuras fungosas.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Chung *et al.*, (2006), los aislamientos de *C. gloesporioides* aislados de frutales sometidos a diferentes concentraciones de tiofanato metil se clasificaron por su respuesta ante los fungicidas como sensibles, poco sensibles, medianamente resistentes y resistentes. En contraste, *C. acutatum* se clasificó por completo como poco sensible.

#### 5.5. Distribución de la sensibilidad de cepas de *Colletotrichum acutatum* al azoxystrobin

La distribución de la sensibilidad al azoxystrobin de las cepas de *C. acutatum*, en etapa de micelio varió entre una dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) de 0.04 a 0.36  $\mu\text{g}$  /ml con una media de 0.14 36  $\mu\text{g}$  /ml en el Valle de Maravatío, mientras que en el Valle de Zamora los valores de  $DE_{50}$  variaron desde 0.07 a 0.99  $\mu\text{g}$  /ml (Figura 15). En caso de los conidios, las  $DE_{50}$  estimadas variaron entre 0.01 a 0.56  $\mu\text{g}$ /ml con una media de 0.1  $\mu\text{g}$ /ml para el Valle de Maravatío, mientras que para el caso de Zamora, los valores variaron de entre 0.006 a 0.15 $\mu\text{g}$ /ml (Cuadro 6). La transformación de los valores de  $CE_{50}$  a logaritmo base 10, normalizaron satisfactoriamente la curva de distribución excepto para las cepas de Zamora en la prueba de sensibilidad de micelio (Figura 16). Ante esto, la mediana es un mejor indicador de la medida de tendencia central de la distribución.

**Cuadro 6.** Estadística básica y momentos de los valores de CE<sub>50</sub> (µg/ml) en micelio y conidios de *C. acutatum* obtenidos de fresa en los Valles de Maravatío y Zamora para el fungicida azoxystrobin, 2009.

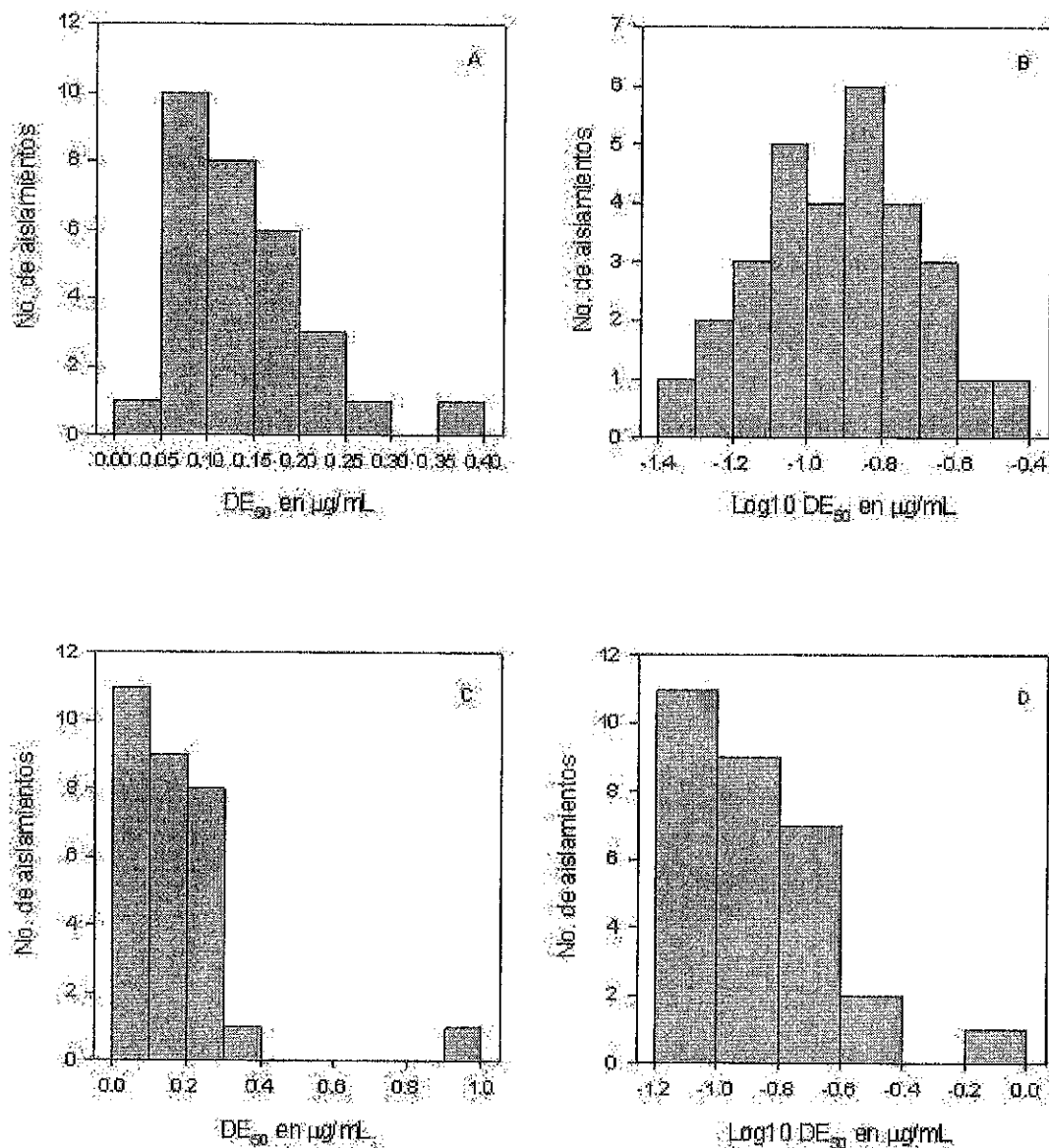
| Variable | Origen    | Media | DS   | Mínimo | Máximo | Mediana | Rango | Skewness | Kurtosis |
|----------|-----------|-------|------|--------|--------|---------|-------|----------|----------|
| Micelio  | V.        | 0.14  | 0.07 | 0.04   | 0.36   | 0.12    | 0.31  | 1.22     | 1.83     |
|          | Maravatío | 0.17  | 0.17 | 0.07   | 0.99   | 0.12    | 0.92  | 4.06     | 19.15    |
|          | V. Zamora |       |      |        |        |         |       |          |          |
| Conidios | V.        | 0.10  | 0.12 | 0.01   | 0.56   | 0.05    | 0.55  | 2.31     | 5.69     |
|          | Maravatío | 0.05  | 0.03 | 0.006  | 0.15   | 0.04    | 0.14  | 0.85     | 0.21     |
|          | V. Zamora |       |      |        |        |         |       |          |          |

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Mondal *et al* (2005), donde, para el fungicida azoxystrobin, los valores de DE<sub>50</sub> fueron de 0.4 µg/ml para *C. acutatum*, y para otra estrobirulina el pyraclostrobin los valores son inferiores, donde *C. acutatum* reporta una DE<sub>50</sub> de 0.029 µg/ml.

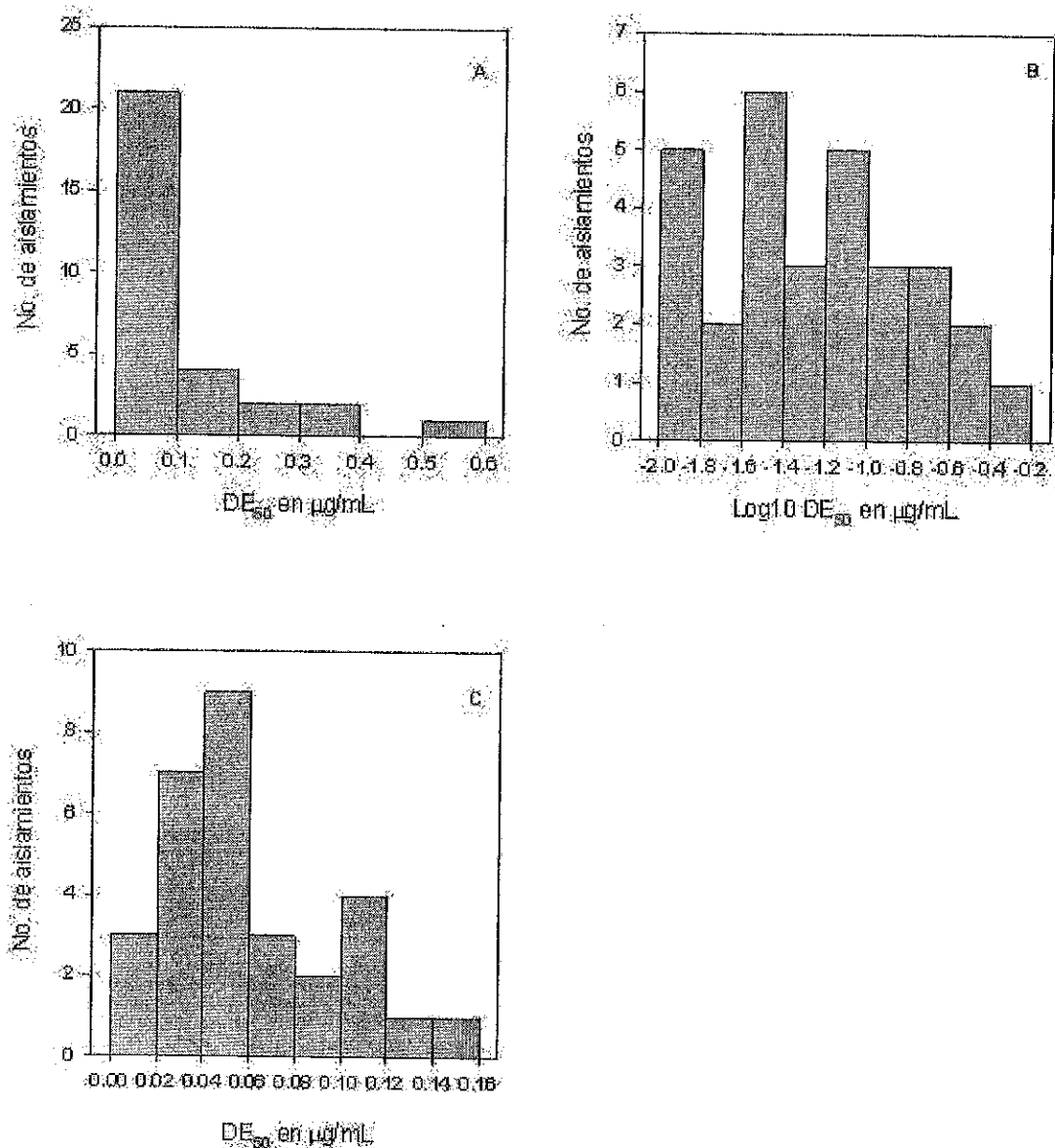
A su vez, Gutiérrez *et al* (2002) evaluaron los fungicidas imazalil, procloraz y azoxystrobin para el control de la antracnosis en frutos de mango (*C. gloesporioides*) cv. Haden, así como la sensibilidad que guardan los diferentes aislamientos a las moléculas, esto en regiones productoras de Sinaloa, Guerrero, Michoacán y Chiapas, México. De acuerdo a los resultados obtenidos para el fungicida azoxystrobin, en todas las zonas productoras, en todos los aislamientos, la concentración efectiva 50 se ubicó entre las 0.000006 a 0.01 µg/ml de ingrediente activo, lo cual señalan los autores como concentraciones bajas o sensibilidad alta.

Peres *et al.* (2009), mostraron que las líneas base para poblaciones de *C. acutatum* al azoxystrobin obtenidas de frutos de cítricos con antracnosis, fueron de 0.30 µg/ml y para aislamientos colectados después del uso comercial de las moléculas fue de 0.13µg/ml. Los valores de DE<sub>50</sub> para el pyraclostrobin fueron de 0.014µg/ml para los años antes de su registro y de 0.011 µg/ml para los años desde que se registraron los productos. En ese reporte ningún aislamiento se ubicó como altamente alterado en su sensibilidad en comparación con los niveles mostrados antes de su uso intensivo. Por lo tanto no existe una señal

que indique que se han desarrollado aislamientos altamente resistentes ni que la sensibilidad se haya perdido en este tiempo.



**Figura. 15.** Distribución de la sensibilidad de micelio de *C. acutatum* obtenidos de frutos de fresa a azoxystrobin: A) Distribución original de los valores de concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) en aislamientos obtenidos del Valle de Maravatío, Mich; B) Logaritmo base 10 de los valores de  $CE_{50}$  en A; C) Distribución de la sensibilidad de aislamientos obtenidos del Valle de Zamora, Mich.; D) Logaritmo base 10 de los valores de  $CE_{50}$  en C.



**Figura. 16.** Distribución de la sensibilidad de conidios de aislamientos de *C. acutatum* obtenidos de fresa a azoxystrobin: A) Distribución original de los valores de concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) en aislamientos obtenidos del Valle de Maravatío, Mich.; B) Logaritmo base 10 de los valores de CE<sub>50</sub> en A; C) Distribución de la CE<sub>50</sub> en aislamientos obtenidos del Valle de Zamora, Mich.

Las distribuciones de sensibilidad al azoxystrobin para *C. acutatum* en ambas zonas de estudio indican que el hongo aún mantiene la sensibilidad al grupo de los Inhibidores externos de quinona después de más de 10 años de la liberación al mercado de este grupo de fungicidas, por lo que aún representan una buena

alternativa para el manejo de antracnosis en fresa. Sin embargo, es importante que se usen estrategias para retardar el desarrollo de resistencia en un futuro.

De lo anterior podemos notar que no existen diferencias significativas entre zonas, pero por otro lado los resultados obtenidos por Zavala *et al* (2005), en *C. gloesporioides* muestra un comportamiento muy diferente, ya que los valores de  $DE_{50}$  se encuentran muy por arriba de los obtenidos para *C. acutatum* con diferencia de más de 250µg/ml. Lo cual sugiere que entre zonas y más aun entre especies del mismo género de hongos existen diferencias en la sensibilidad a una misma molécula.

Los estudios realizados por Wong *et al.* (2007) para evaluar la sensibilidad de *C. cereale* a fungicidas Qol's, encontraron que la concentración efectiva 50 está entre 0.006 a 0.089µg/ml de azoxystrobin entre las cepas no expuestas a aplicaciones y para el caso de las cepas expuestas, dosis de 8µg/mL no fueron suficientes para inhibir por completo el desarrollo del hongo.

### **5.5.3. Relación de la sensibilidad de conidios y micelio al azoxystrobin**

El análisis de correlación de Pearson para conocer la asociación entre la sensibilidad de conidios con el micelio en las dos zonas de estudio indicó que una baja correlación en la sensibilidad de ambas estructuras fungosas ( $r=0.134$ ,  $P=0.479$ ) en el Valle de Maravatío, similar a lo obtenido en el Valle de Zamora donde tampoco se encontró una correlación entre la sensibilidad de micelio y la de conidios ( $r=-0.033$   $P=0.861$ ).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que ambas zonas de estudio aun mantienen una alta sensibilidad a los fungicidas evaluados. Sin embargo debido al potencial que presentan los patógenos de desarrollar resistencia es recomendable monitorear periódicamente la sensibilidad a fin de evitar o

posponer el desarrollo de resistencia en este hongo en las zonas productoras de fresa de México.

## 6. CONCLUSIONES

El patógeno aislado de lesiones típicas de antracnosis en frutos, estolones y hojas de fresa correspondió a *Colletotrichum acutatum*, confirmado a través de métodos morfológicos y moleculares por medio de PCR.

El modelo de predicción log-logístico con asíntota superior fue adecuado para describir el crecimiento relativo de micelio y la germinación relativa de conidios a diferentes dosis de fungicidas y estimar las  $DE_{50}$ .

La sensibilidad de las cepas de *Colletotrichum acutatum* al tiofanato metílico, en etapa de micelio varió entre una  $DE_{50}$  de 0.28 a 9.72  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Maravatío y de 1.39 a 2.99  $\mu\text{g/ml}$  en el de Zamora.

La sensibilidad de las cepas de *Colletotrichum acutatum* al tiofanato metílico, en etapa de conidio varió entre una  $DE_{50}$  de 0.9 a 396.4  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Maravatío y de 0.43 a 63.32  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Zamora.

La sensibilidad de las cepas de *C. acutatum* al azoxystrobin, en etapa de micelio varió entre una  $DE_{50}$  de 0.04 a 0.36  $\mu\text{g/ml}$  en Maravatío y de 0.07 a 0.99  $\mu\text{g/ml}$  en el Valle de Zamora.

La distribución de la sensibilidad de las cepas de *C. acutatum* al azoxystrobin, en conidios, estuvo entre 0.01 a 0.56  $\mu\text{g/ml}$  para el Valle de Maravatío y 0.006 a 0.15  $\mu\text{g/ml}$  para el Valle de Zamora.

No existieron correlaciones significativas entre la sensibilidad de conidios con la de micelio en ambos fungicidas probados.

En general, se concluye que las poblaciones de *C. acutatum* del Valle de Maravatío y Zamora, mantienen la sensibilidad al azoxystrobin, y al tiofanato

metílico. Sin embargo, la distribución de la sensibilidad en este último fue más disperso, con individuos que superaron los 390  $\mu\text{g/ml}$  en conidios.

## 7. LITERATURA CITADA

- Acosta, R. M. 2002. La antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides* Penz.) del mango (*Mangifera indica* L.) cv Haden: Patogenicidad, Control Químico, Manejo y Epidemiología. Tesis de grado. Montecillo, Texcoco, México.
- Agrios, G. N. 2007. Fitopatología. 2ª edición. Ed. Limusa. México, D. F. 838 p.
- Alves-Santos, F. M., B. Ramos, M. A. García-Sánchez, A. P. Eslava y J. M. Díaz-Minguez. 2002. A DNA-based procedure for in planta detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. Phytopathology. Vol. 92. No. 3 Pp 237-244.
- Brent, K. y Hollomon, D. 2007. Fungicide resistance in crops pathogens; how can it be managed? 2ª ed. Published by the Fungicide Resistance Action Committee. CropLife International. Brussels, Belgium. 58p.
- Calle, B. J. 2005. Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Universidad de Puerto Rico. Tesis de Grado. Recinto Universitario de Mayaguez. 115p.
- Castro F., J. y P. A. Dávalos G. 1987. Control químico de las pudriciones del fruto de la fresa causada por *Phytophthora cactorum* y *Colletotrichum* sp. In: Sociedad Mexicana de Fitopatología. 1987. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitopatología. SMF – UMSNH. Morelia, Mich. Pp 136.
- Chung, W.-H., Ishii, H., Nishimura, K., Fukaya, M., Yano, K., and Kajitani, Y. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. Plant Dis. 90:506-512.
- Damicone, J. and D. Smith. 2009. Fungicide Resistance Management. Oklahoma Cooperative Extension Service. Fact Sheet EPP-7663-8
- Darrow, G. M. 1966. The Strawberry: History, Breeding and Physiology, New York: Holt, Rinehart and Winston.
- Dávalos G., P. A., J. Castro F. 1987. Estimación de daños por *Colletotrichum* sp. y *Phytophthora cactorum* principales causantes de la pudrición de la

- fresa en Irapuato, Gto. *In*: Sociedad Mexicana de Fitopatología. 1987. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitopatología. SMF – UMSNH. Morelia, Mich. 136 p.
- De los Santos G. de P., B. y F. Romero M. 2002. Effect of different fungicides in the control of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose crown rot in strawberry plants. *Crop Protection* 21 (2002) 11–15.
- Dekker, J. 1988. Fungicide resistance in crop protection. Wageningen: center for agricultural publishing and documentation. Pp. 1-15.
- Dekker, J. 1995. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. *Modern selective fungicides*. Ed. H L&R. Pp. 23-38.
- Denoyes, R. B., Lafargue, M., Guerin, G., y Clerjeau, M. 1999. Fruit resistance to *Colletotrichum acutatum* in strawberries. *Plant Dis.* 83:549-553.
- Denoyes, R.B., Guérin, G., Lerceteau, K., E., and Risser, G. 2005. Inheritance of resistance to *Colletotrichum acutatum* in *Fragaria x ananassa*. *Phytopathology* 95 No. 4 :405-412.
- Farrera, R. E., Zambrano, A.E.y Ortiz, F.A. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Rev. Fac. Agron.* v. 24 n. 2 Caracas.
- Freeman, S. 2008. Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *HortScience*. Vol. 43 No. 1. pp. 66-68.
- Freeman, S. y Katan, T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. The American Phytopathological Society. *Phytopathology*. Vol. 87, No. 5.
- Freeman, S., T. Katan y E. Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* Vol. 82 No.6.
- Garrido, C., M. Carbú, F. J. Fernández-Acero, N. Boonham, A. Colyer, J. M. Cantoral y G. Budge. 2009. Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathology* (2009) 58, 43–51.

- Georgopoulos, S. G. 1995. The genetics of fungicide resistance. Modern selective fungicides. Properties Applications mechanisms of action. Editorial. B y H LyR. pp. 23-38.
- Jackson, D. I. y E. Looney N. 1999. Producción de frutas de climas templados y subtropicales. Ed Acribia S.A. Zaragoza, España. 382p.
- Leandro, L. F. S., Gleason, M. L., Nutter, F. W. Jr., Wegulo, S. N. y Dixon, P. M. 2003. Influence of temperature and wetness duration on conidia and appressoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Phytopathology. Vol. 93, No. 4, pp. 513-520.
- Leandro, L. F. S., Gleason, M. L., Nutter, F. W., Jr., Wegulo, S. N., and Dixon, P. M. 2001. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Phytopathology 91:659-664.
- Lewis Ivey, M. L., C. Nava D. y Miller, S. A. 2004. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. Plant Dis. 88:1198-1204 No. 11.
- López A., J. M. 2008. El cultivo de la Fresa en Huelva. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de publicaciones y divulgación. Huelva, España. 341p.
- Maas, J. L. 1998. Compendium of Strawberry Diseases. 2a Ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul Minnesota, USA. 98 p.
- Mackenzie, S. y Peres, N. 2007. *Colletotrichum* crown rot (anthracnose crown rot) of strawberries. Publicación PP 238 serie Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Web de la EDIS: <http://edis.ifas.ufl.edu>. Fecha de consulta: 09 de octubre de 2009.
- Medina, R. y Aguirre, M. 2007. El sistema Fresa en México y Michoacán. In: La Fresa en Michoacán: Los retos del Mercado. Ed. Berdegú J. y San Clemente X. Gobierno del Estado de Michoacán, CONAFRESA, SEDAGRO. 21-29 p.
- Mendoza Z, C. 1987. Principales enfermedades fungosas y control químico de la cenicilla de la fresa (*Fragaria chiloensis* Duchesne var *Ananassa*) en

- Villa Guerrero, Estado de México. Tesis de grado. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 126 p.
- Mertely, J. C., and Legard, D. E. 2004. Detection, isolation, and pathogenicity of *Colletotrichum* spp. from strawberry petioles. *Plant Disease*. 88:407-412.
- Mondal, S. N., Bhatia, A., Shilts, T., y Timmer, L. W. 2005. Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin and fenbuconazole. *Plant Disease*. 89:1186-1194.
- Pascual, C. B., T. Toda, A. D. Raymondo y M. Hyakumachi. 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology* (2000) 49, 108–118.
- Peres, N. A. R., Souza, N. L., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis*. 88:125-130.
- Peres, N. A., T. E. Seijo y C. Moyer. 2009. Baseline sensitivities of isolates of *Colletotrichum acutatum* to strobilurin. *In: APS Annual Meeting Abstracts of Presentations*. APS Annual Meeting in Portland, Oregon, August 1–5, 2009. *Phytopathology* Vol. 99, No. 6 (Supplement).
- Peres, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E. y Correll, J. C. 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* August Vol. 89 No. 8.
- Poling, E. B. 2008. Anthracnose on strawberry: its etiology, epidemiology, and pathology, together with management strategies for strawberry nurseries: introduction to the workshop. *HortScience*. Vol. 43 No. 1. pp. 59-65.
- Ramírez, V.J. 1991. Cultivo y enfermedades del mango. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán Sinaloa, México.
- Rebollar-Alviter, A., Madden, L. V., Jeffers, S. N., and Ellis, M. A. 2007. Baseline and differential sensitivity to two Qol fungicides among isolates of *Phytophthora cactorum* that cause leather rot and crown rot on strawberry. *Plant Dis*. 91:1625-1637.

- Rodríguez, M. R. y Jiménez, A. L. 1985. El problema de la tolerancia de *Mycosphaerella fijiensis* al fungicida benomil en plantaciones bananeras de Costa Rica. ASBANA. San José, Costa Rica. Pp. 16.
- Rusell, P.E. 1995. Fungicide resistance: occurrence and management. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 124:317-323.
- Shi, A., Kantartzi, S. K., Mmbaga, M. T., Chen, P., Mrema, F. y Nnodu, E. 2008. PCR-based markers for detection of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in flowering dogwood (*Cornus florida*). *Australasian Plant Pathology*. Vol. 37 No. 1. pp. 65-68.
- Shuman, J. L., and J. R. Ballington. 2003. Incidence and development of anthracnose fruit rot in seven strawberry genotypes inoculated with five concentrations of *Colletotrichum acutatum*. *Acta Horticulturae*. No. 626, pp. 199-205.
- Smith, B. J. 2008. Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: a North American perspective. *HortScience*. Vol. 43 No. 1. pp. 69-73.
- Smith, B. J. and T. Cochran. 2009. Strawberry Anthracnose: Cultural Control Options *In: Berry Notes*. Ed. Sonia Schloemann. UMass Extension Agriculture & Landscape Program June 2009 Vol. 21, No. 6
- Smith, I. M., Dunez, J., Phillips, D. H., Lelliott, R. A., Archer, S. A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ed. Mundi-Prensa. Bilbao, España. 671p.
- Staub, T. 1991. Fungicide resistance: practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annual Review of Phytopathology* 29:421-442.
- Téliz O., D., A. Mendoza H. y J. Sandoval. 1986. Enfermedades de la fresa en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 4:1-12.
- Téliz, D., y A. Mora A. 2007. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa 2ª ed. D.F. México. 321p.
- Tredway, L. P., M. D. Soika y M. L. Bunting. 2009. Fungicide sensitivity in North Carolina populations of *Colletotrichum cereale* and molecular

- characterization of benzimidazole- and Qolinsensitive strains. *Phytopathology* 98:S159.
- Trout, C. L., J. B. Ristaino, M. Madritch y T. Wangsomboondee. 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. *Plant Disease*. Vol. 81 No. 9 Pp 1042-1048.
- Turecheck, B. and C. Heidenreich. 2005. Strawberry Anthracnose *In: Berry Notes*. Ed. Sonia Schloemann. UMass Extension Agriculture & Landscape Program. January 2005, Vol. 17, No. 1.
- Villanueva A., R., A. M. Hernández A., M. J. Yáñez M., D. Téliz O., A. Mora A., E. Cárdenas S. y A. Castañeda Vildózola. 2005. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. *Agrociencia* enero-febrero, vol. 39, numero 001. Pp. 93-106.
- Washington, W. S., N. Shanmuganathan y C. Forbes. 1992. Fungicide control of strawberry fruit rots, and the field occurrence of resistance of *Botrytis cinerea* to iprodione, benomyl and dichlofluanid. *Crop Protection* Vol. 11 August 1992.
- Wedge, D. E., B. J. Smith, J. P. Quebedeaux y R. J. Constantin. 2007. Fungicide management strategies for control of strawberry fruit rot diseases in Louisiana and Mississippi. *Crop Protection* 26 (2007) 1449–1458.
- Wharton, S. P. y Diéguez, U. J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del jardín botánico de Madrid* 61 (1) 3:22.
- Wong, F. P., Midland, S. L., and de la Cerda, K. A. 2007. Occurrence and distribution of Qol-resistantisolates of *Colletotrichum cereale* from annual bluegrass in California. *Plant Dis.*91:1536-1546.
- Young, J. R., M. T. Peterson, F. P. Wong y K. de la Cerda. 2009. Thiophanate methyl-resistant *Colletotrichum cereale* isolates exhibiting amino acid substitutions in the beta-tubulin 2 gene. *Phytopathology* 98:S178.
- Zavala-León, M.J., J. M. Tun-Suárez, J. Cristóbal-Alejo, E. Ruíz-Sánchez, O. Gutiérrez-Alonso, M. Vásquez-Calderón y R. Méndez-González. 2005. Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de

*Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Sacc. A fungicidas organosintéticos. Revista Chapingo serie horticultura. Julio-diciembre vol 11 núm. 002. Pp 251-255.

## 8. ANEXO 1

### Extracción de DNA por método rápido.

1. Se toma una muestra de la cepa con la punta de una micropipeta o espátula pequeña directamente de la caja de petri y se coloca en un tubo eppendorf de 2 mL que contenga 30µL de una solución de lisis desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología de semillas del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
2. Se colocaron los tubos a 95 °C por 5 min en un Termociclador modelo-FPROGO2Y Techne Progene® correspondiente al programa 25.
3. Una vez concluido ese tiempo se llevan los tubos a centrifugación por 5 min a 12,000 gravedades.
4. En tubos nuevos se colocan 45 µL de agua para PCR y se les agregan 5 µL del sobrenadante obtenido tras la centrifugación.
5. Ahora esta mezcla se coloca 2 min a centrifugación para su mezcla perfecta.
6. De esta mezcla se toman 5 µL para colocarlos en tubos nuevos que contienen 20 µL de la solución Master Mix (Taq polimerasa: 0.4 µL, MgCl<sub>2</sub>: 2 µL, Buffer: 5 µL, Primer 1: 2 µL, Primer 2: 2 µL, dNTPs: 2 µL y Agua: 6.6 µL) y se llevan al termociclador para su amplificación.

### Extracción de DNA método de Sambrook (1986) y Bainbridge *et al*, 1990 modificado por Cámara (2001), para bacterias y hongos.

1. Se toma una muestra de la cepa de hongo o bacteria con la punta de una micropipeta o espátula pequeña directamente de la caja de petri o se macera la colonia completa, raspando con espátula en un mortero con nitrógeno líquido y el producto se coloca en un tubo eppendorf de 2 mL que contenga 600 µL de una solución de lisis constituida por tris base HCl pH 8, EDTA 2H<sub>2</sub>O pH 8, Proteinasa K y Triton X100 0.5%.

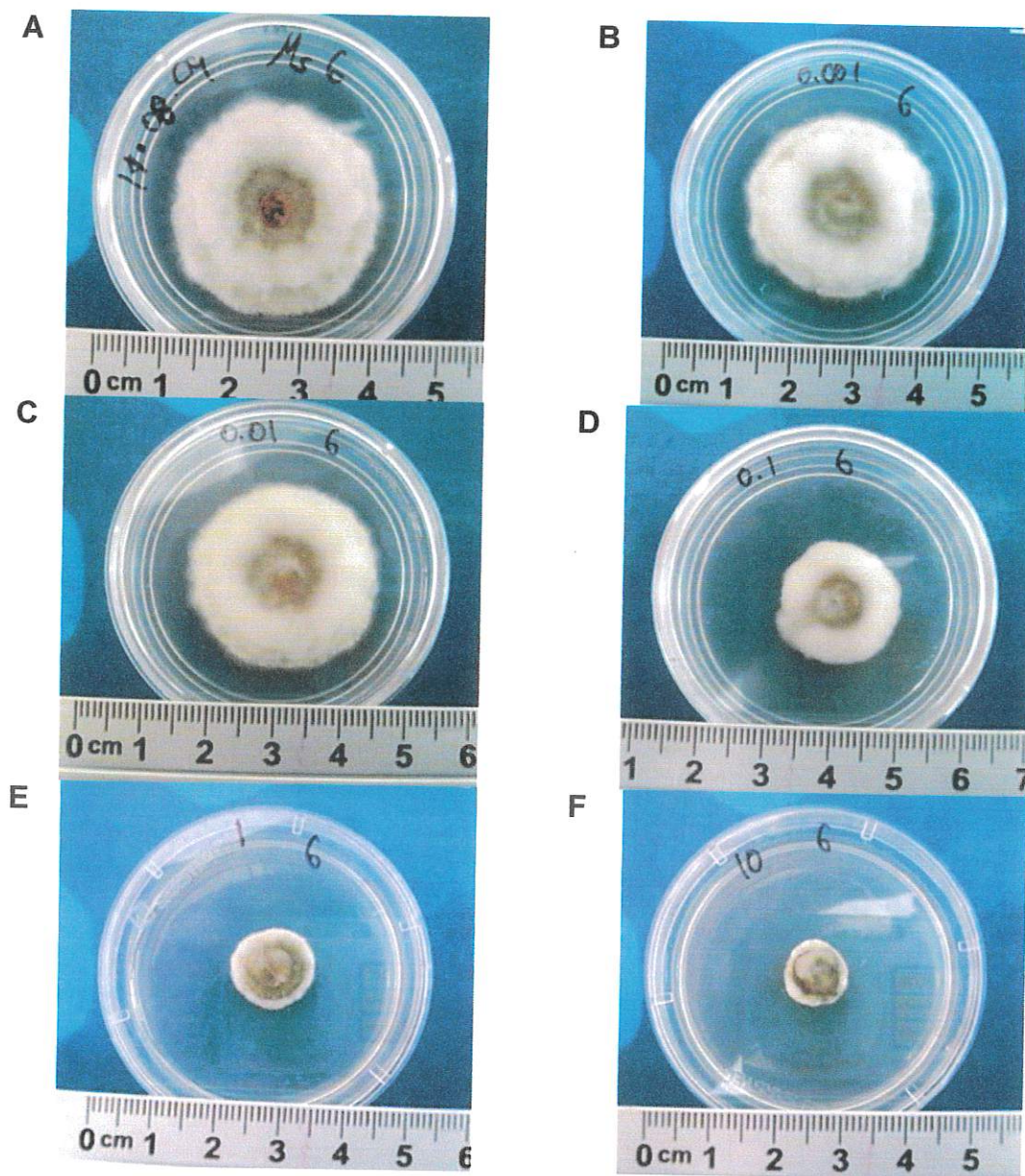
2. Enseguida se incuba a 37 °C hasta el día siguiente o incubar a 80 °C por una hora y treinta minutos.
3. Posteriormente se agregan 150 µL de NaCl al 1.5M, 700 µL de fenol equilibrado y 300 µL de cloroformo. Mezclar por inversión de tubos.
4. Posteriormente centrifugar por 10 min.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregan 600 µL de etanol.
6. Posteriormente se deja reposar hasta el día siguiente en refrigeración a 4 °C para que el DNA se precipite. También se puede refrigerar por 2 horas a -20 °C.
7. Enseguida los tubos se centrifugan por 20 min. Una vez formada la pastilla se decanta cuidadosamente el sobrenadante.
8. Posteriormente la pastilla se lava con isopropanol al 70%, se centrifuga por 3 min y se vuelve a decantar cuidadosamente para eliminar el isopropanol sin que se caiga la pastilla.
9. Esperar que la pastilla se seque invirtiendo los tubos y dejándolos a temperatura ambiente.
10. Posteriormente se disuelve el DNA agregando 80 µL de TE pH 8.0
11. Finalmente se obtiene la muestra para su amplificación, de la misma forma que para método rápido.

### **Electroforesis en gel de agarosa**

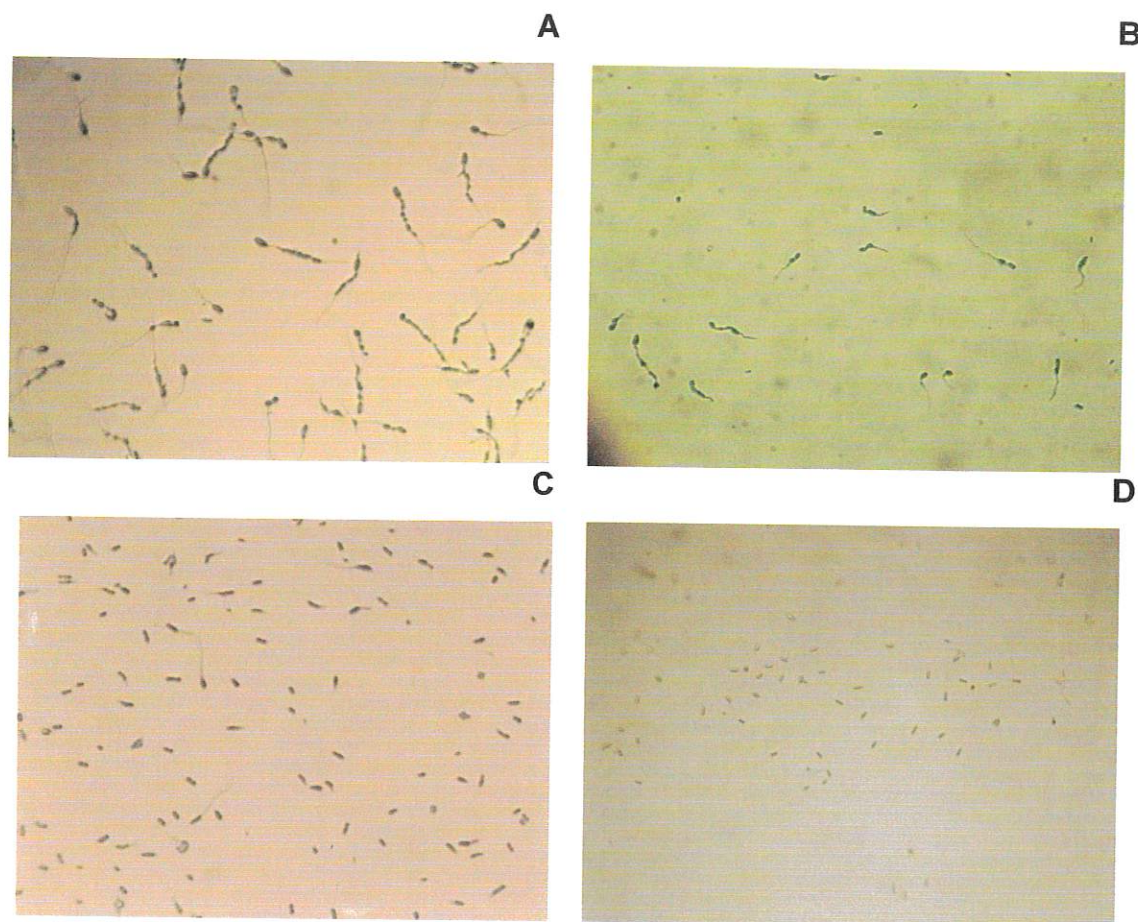
1. Como primer paso para realizar electroforesis se procede a preparar un gel de agarosa 1.5%, donde se disuelven 3g de agarosa por cada 200mL de una solución de buffer TAE 1X, la cual está compuesta por Tris, Acetato y EDTA. Esta mezcla de buffer y agar se calienta en microondas para disolver completamente y lograr una mezcla hialina. Una vez disuelto el agar se deja enfriar un poco y se procede a vaciar en el porta gel de la cámara de electroforesis y se colocan los peines correspondientes para formar los pozos.

2. Enseguida se agrega la cantidad de buffer TBE suficiente para cubrir el gel y se procede a llenar los pozos con las muestras.
3. Para depositar las muestras es necesario mezclar sobre un plástico unas gotitas (2 $\mu$ l) de buffer de carga Green 5x o similar y una alícuota de la muestra (10 $\mu$ l) que se obtuvo en el procedimiento de extracción de DNA y se homogeniza para depositar una sola gota en un pozo del gel. Se colocara una muestra por pozo.
4. Una vez llenos los pozos, se coloca la tapa de la cámara de electroforesis con los cables de corriente (rojo) y tierra (negro) conectados a la fuente de poder. Encender la fuente de poder y programarla al voltaje recomendado por el fabricante. Se debe tener cuidado que la corrida se esté realizando en el sentido correcto. Se deja que la marca del buffer de carga llegue aproximadamente al 75% del tamaño del gel y se apaga la cámara.
5. Se saca el gel y se lleva a revelado para visualizar las bandas en un transiluminador o fotodocumentador de luz UV.

## ANEXO 2.



**Figura 17.** Inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum acutatum*, en medio de cultivo PDA con diferentes concentraciones de azoxystrobin. A) Testigo, B) 0.001 µg/ml, C) 0.01 µg/ml, D) 0.1 µg/ml, E) 1 µg/ml, F) 10 µg/ml.



**Figura 18.** Inhibición de la germinación de conidios de *Colletotrichum acutatum*, en medio de cultivo Agua-Agar con diferentes concentraciones de tiofanato metílico. A) Testigo sin fungicida, B) 100µg/ml, C) 1000µg/ml, D) 2000µg/ml