



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS PATÓGENOS EN POSTCOSECHA ASOCIADOS A SÍNTOMAS DE ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE AGUACATE

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN

CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

GUADALUPE SÁNCHEZ BOLÓN

Chapingo, Estado de México, diciembre de 2012

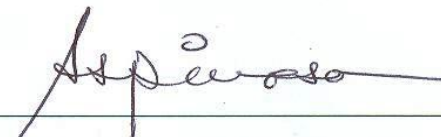
**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS
PATÓGENOS EN POSTCOSECHA ASOCIADOS A SÍNTOMAS DE
ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE AGUACATE**

Tesis realizada por **Guadalupe Sánchez Bolón** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:


DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES

ASESORA:


DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:


DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESORA:


DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS

DEDICATORIA

A mis padres: Catalina Bolón de la Cruz y Mauricio Francisco Sánchez Bautista por darme la oportunidad de crecer en familia a lado de Elizabeth, Humberto y Judith, que sin duda alguna es la mejor de la dichas que pude tener en la vida.

A Armando Rosas Sánchez por enseñarme a trabajar en equipo, por su amor y eterna paciencia y por impulsarme a realizarme profesionalmente.

A todos los niños cortadores de caña de azúcar que me inspiran y motivan a saber que no existe nada difícil en la vida y que todo depende de la actitud con que te enfrentes a ella.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por ser la mejor y más bondadosa escuela de formación que puede tener cualquier joven estudiante.

Al Dr. Teodoro Espinosa Solares que con paciencia y buen humor siempre estuvo dispuesto a asesorarme y apoyarme en todo el desarrollo de esta investigación. Por enseñarme que el ser investigador no te hace ser menos humano que otro cualquiera.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por su disposición y paciencia por asesorarme durante la fase molecular de la investigación y por adentrarme al misterioso mundo de los genes.

Al Dr. Juan Carlos Reyes Alemán y a la Fundación Sánchez Colín por las facilidades otorgadas en la obtención de los frutos de aguacate.

A los técnicos de laboratorio Sr. Alberto y Sra. Dolores por darme las facilidades para el desarrollo de la parte experimental.

Al Dr. Gustavo Mena Nevarez por las aportaciones y asesorías a este trabajo de investigación.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos y a la Dra. Consuelo Lobato Calleros por la asesoría y el tiempo dedicado a este trabajo.

A la M. C. María de Jesús por sus aportaciones a este trabajo y Alfredo Nava por su apoyo en campo en la colecta de aguacates.

A todos los maestros que me formaron en los dos años de maestría y la Sra. Esperanza Salinas por el apoyo en el los tramites de titulación.

A Alfredo Garcidueñas y Hugo Sánchez por el apoyo en los tramites para que llegara este día.

A mis amigos de la maestría: Araceli, Flor Adriana, Irene, Juan Carlos, Cristóbal y Celerino por los momentos compartidos.

DATOS BIOGRÁFICOS

Guadalupe Sánchez Bolón, nació en Tenosique, Tabasco, obtuvo el título de Ingeniero en Agroalimentos en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco con titulación por promedio. En el año 2005 inicia laboralmente en la industria azucarera, estando en los ingenios Azsuremex, Aaron Saenz Garza, San Rafael de Pucté y finalmente en el ingenio de Tres Valles, Veracruz. Durante su desarrollo profesional desempeñó puestos como químico analista de karbe, de análisis especiales, jefe de tratamiento de aguas y auxiliar de control de calidad; participó en auditorias de calidad y formó parte del equipo HACCP, donde desarrolló habilidades en el manejo de personal. Actualmente labora para HT FOODS como jefe de aseguramiento de la calidad, en la ciudad de Cocula Jalisco.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS PATÓGENOS EN POSTCOSECHA ASOCIADOS A SÍNTOMAS DE ANTRACNOSIS EN FRUTOS DE AGUACATE

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PATHOGENIC FUNGI IN POSTHARVEST ASSOCIATED SYMPTOMS OF ANTHRACNOSE IN AVOCADO

Sánchez-Bolón, G.; Espinosa-Solares, T; Valadez-Moctezuma' E; Acosta-Ramos, M; Lobato-Calleros, C.

Resumen

Se aislaron cepas de hongos asociados con síntomas de antracnosis en frutos de diferentes variedades de aguacate en postcosecha. Las cepas se analizaron morfológicamente considerando su comportamiento en medio de cultivo, color, estructuras morfológicas, tasa de crecimiento micelial (TCM) y pruebas de patogenidad. La caracterización molecular consistió en PCR-RFLP de la región ITS 5HP-NL4 que agrupó a las cepas en cuatro grupos principales, los cuales se asociaron fenotípicamente con un análisis de componentes principales de las características morfológicas. Finalmente, se secuenció la región ITS 4B-ITS 5HP que permitió la obtención de un fragmento de 750 pb. El análisis de conglomerados de los datos dio como resultado cuatro especies de hongos fitopatógenos dentro de los cuales se encuentran *Glomerella cingulata*, *Fusarium*, *Neofusicoccum* y *Fungal sp.*

Palabras clave: antracnosis, PCR-RFLP, secuenciación, *Colletotruichum*, *Fusarium* y *Neofusicoccum*.

Abstract

Fungus strains associated with symptoms of anthracnose in fruits of different varieties of avocado postharvest were isolated. These fungi were analyzed morphologically and molecularly. It was considered the following characteristics: behavior in culture, color, morphological structures, mycelial growth rate (RGM) and pathogenicity tests. The molecular characterization consisted of PCR-RFLP of the ITS region 5HP-NL4. The results indicated that, based on principal component analysis of morphological features, there are four main groups phenotypically associated. The ITS ITS sequenced region 4B-5HP allowed obtaining a fragment of 750 pb. The identified phytopathogenic fungi were, *Glomerella cingulata*, *Fusarium*, *Fungal sp.* and *Neofusicoccum*. The cluster analysis of the molecular data resulted in four groups of different species.

Keywords: anthracnose, PCR-RFLP, sequencing, *Colletotruichum*, *Fusarium* and *Neofusicoccum*.

CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DATOS BIOGRÁFICOS	v
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Patógenos en postcosecha de aguacate	4
2.2 La antracnosis como enfermedad postcosecha en aguacate	4
2.2.1 Agente causal de la antracnosis	6
2.3 Técnicas moleculares para la identificación de especies	9
2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	10
2.3.2 Espacio transcrito interno (ITS).....	12

2.3.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)	14
2.3.4 Secuenciación de ácidos nucleicos	15
3.- OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo General:	16
3.2 Objetivos Particulares:	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Colección de muestras	17
4.2 Obtención del patógeno	19
4.3 Caracterización morfológica	19
4.4 Pruebas de patogenicidad	20
4.5 Caracterización molecular del patógeno	20
4.5.1 Extracción de DNA	20
4.5.2 Amplificación por PCR-RFLPs de la región de ITS	22
4.6 Secuenciación de DNA	26
4.6.1 Limpieza de las amplificaciones	26
4.6.2 Reacción de secuenciación	26
4.7 Análisis estadístico	27

4.7.1 Caracterización morfológica.....	27
4.7.2 Caracterización molecular.....	28
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
5.1 Colección de las muestras por variedades y obtención del patógeno	30
5.2 Caracterización morfológica.....	32
5.3 Análisis de componentes principales para las características morfológicas de los hongos	33
5.4 Caracterización molecular.....	40
5.4.1 Extracción de DNA.....	40
5.5 Análisis de secuencias	50
6.- CONCLUSIONES.....	60
7.- LITERATURA CONSULTADA.....	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación de las variedades de aguacate procedentes del banco de germoplasma de la fundación Sánchez Colín.....	17
Cuadro 2. Mezcla de PCR por muestra donde; 1. Concentración del Stock de cada uno de los reactivos empleados, 2. Volumen tomado del stock para cada reactivo, 3. Total de cada concentración presente en 25 µL de la mezcla de reacción, 4. Concentración final de los reactivos en 25 µL, 5. Volumen de reactivos para una reacción de 12 muestras.	23
Cuadro 3. Determinación de la cantidad de reactivo utilizado en la secuenciación del gen ITS.....	27
Cuadro 4. Características morfológicas de los aislamientos obtenidas de cada variedad de aguacate.	32
Cuadro 5. Matriz de datos con variables morfológicas de los aislamientos	34
Cuadro 6. Tamaño estimado en pares de base (pb) de los cortes realizados por la enzima <i>Hae</i> III	45
Cuadro 7. Tamaño estimado en pares de base (pb) de los cortes realizados por la enzima <i>Hha</i> I.	46
Cuadro 8. Tamaño estimado en pares de base (pb) de los cortes realizados por la enzima <i>Hinf</i> I.	47

Cuadro 9. . Relación de secuencias reportadas en el NCBI para los aislamientos de aguacate con síntomas de antracnosis.....	53
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Ciclo de la atractosis por <i>Colletotrichum</i> , <i>Glomerella cingulata</i> o <i>Gloesporium</i>	8
Figura 2. Representación gráfica de la PCR.....	11
Figura 3. Región espaciadora interna transcrita.	13
Figura 4. Fruto con síntomas de antracnosis.....	18
Figura 5. Montaje del gel de acrilamida al 8 %.	25
Figura 6. Frutos de aguacate con síntomas de antracnosis.	30
Figura 7.Colección de muestras de aguacate de diferentes variedades con sus aislamientos y características morfológicas.....	32
Figura 8. Representación gráfica del análisis de componentes principales.....	35
Figura 9. Cepas y conidas representantes del grupo A aislados de las variedades 1.- Amarillo Charly, 2. Sujeto 2PF2, 3. Colín V-33, 4. Sujeto 3PF2 y 5. Pionero.	36
Figura 10. Cepas representativas del grupo B a 8 d de crecimiento en PDA aisladas de las variedades 1. Hass Jiménez, 2. Bacon, 3. Fuerte, 4. Encinos, 5. Reed, y 6. 55-PV2.....	37

Figura 11. Conidias de ocho días de crecimiento en PDA de la var. Hass Jiménez, Bacon, Fuerte, Encinos, Reed, y 55PV2	38
Figura 12. Cepa y conidia representativa del grupo 3 (C) con 8 d de crecimiento en PDA aislada de la variedad Ariete.	39
Figura 13. Electroforesis en agarosa 0.8% de DNA de doce cepas de hongos aislados de diferentes variedades de aguacate (1. Hass Jiménez, 2. Bacon, 3. Amarillo Charly, 4. Ariete, 5. Sujeto 2PF2, 6. Colín V-33, 7. Sujeto 3 PF2, 8. Fuerte, 9. Encinos, 10. Pionero, 11. Reed, 12. 55PV2).....	41
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1.2 % de los productos de ITS amplificados con los iniciadores ITS5HP-NL4. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb GeneRuler™. (1. Hass Jiménez, 2. Bacon, 3. Amarillo Charly, 4. Ariete, 5. Sujeto 2PF2, 6. Colín V-33, 7. Sujeto 3 PF2, 8. Fuerte, 9. Encinos, 10. Pionero, 11. Reed, 12. 55PV2).....	42
Figura 15. Fragmentos de restricción producidos por los cortes de las enzimas Hae III Hha I y Hinf I. Los carriles de los extremos corresponden al marcador de peso molecular de 100pb de Fermentas®. (1. Hass Jiménez, 2. Bacon, 3. Amarillo Charly, 4. Ariete, 5. Sujeto 2PF2, 6. Colín V-33, 7. Sujeto 3 PF2, 8. Fuerte, 9. Encinos, 10. Pionero, 11. Reed, 12. 55PV2).	44
Figura 16. Dendrograma obtenido con el método de remuestreo bootstrap del software Free Tree a partir del perfil de restricción generado con PCR-RFLP de la región de ITS de las 12 cepas de hongos fitopatógenos.	49

Figura 17. Electroferograma generado con el secuenciador 3130x Applied Biosystems.....	51
Figura 18. Secuencia consenso de DNA.	52
Figura 19. Filograma construido con el coeficiente de similitud Neighbor joining utilizando secuencias de ITS (Internal spacer transcribed) de los genotipos de <i>Fusarium sp</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Neofusicoccum arbuti</i> , <i>Glomerella cingulata</i> y <i>Fungal s sp.</i> aislados de aguacate.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análisis de componentes principales
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilendiaminotetraacético
ITS	Secuencias Internas Transcritas
mtDNA	DNA mitocondrial
rDNA	DNA ribosomal
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA	Papa dextrosa agar
rDNA	DNA ribosomal
RFLP	Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción
NCBI	National Center for Biotechnology information

1.- INTRODUCCIÓN

El aguacate es nativo de América y fue domesticado extendiéndose por varias regiones de México y Centroamérica. La importancia socioeconómica de este fruto se deriva del beneficio que derrama su comercialización entre productores, industrializadores y consumidores. México cuenta con una producción de 1.10 millones de toneladas y exporta 326, 127 toneladas al año; ocupando así el primer lugar en los dos rubros; seguido por Chile, República Dominicana e Indonesia (FAOSTAT, 2010).

Dentro de las enfermedades que pueden limitar el cultivo, las consideradas de postcosecha ocupan un lugar importante; éstas son generalmente ocasionadas por hongos fitopatógenos. La antracnosis en aguacate es una de las enfermedades postcosecha de mayor importancia económica. El agente causal es el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y genera pérdidas de hasta el 20 % de la producción en México (Rodríguez *et al.*, 2009). Los hongos filamentosos del género *Colletotrichum* y su telemorfo *Glomerella* son considerados los principales patógenos de plantas en todo el mundo (Freeman *et al.*, 1998).

La antracnosis se presenta en el campo y ataca a frutos sin madurar, donde las esporas germinadas producen apresorios que germinan y provocan la ruptura de la cutícula, pero las hifas subcuticulares permanecen en estado de reposo o “quiescente” y se desarrollan hasta que la fruta es cosechada y empieza su maduración (Prusky, 1996; Freeman *et al.*, 1998). Esto ocurre debido a que el fruto produce de manera natural un compuesto antifúngico denominado 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxoheneicosa-12.15-dieno localizado en el pericarpio del fruto inmaduro (Prusky, 1996; Domergue *et al.*, 2000; Moualem y Prusky, 2000). Los síntomas de la enfermedad se incrementan si el manejo postcosecha no es el adecuado, ya que se pueden presentar daños en las lenticelas, provocando daños en la apariencia de los frutos cuando llegan al mercado. Además. Se facilita el desarrollo de la infección presentando manchas de color marrón oscuro durante el almacenamiento (Zamora *et al.*, 2001; Everett *et al.*, 2008).

El diagnóstico oportuno de los patógenos causantes de enfermedades, así como el conocimiento de la diversidad genética de los mismos, es fundamental para desarrollar medidas de control efectivas. La información genética de todos los organismos, es decir, la información que determina qué es lo que un organismo puede ser y hacer, está codificada en su DNA (ácido desoxirribonucleico). En los hongos fitopatógenos que atacan al fruto, la generación de nuevas variantes se convierte en un factor esencial de sobrevivencia (Agrios, 2005). Los métodos de identificación tradicional siguen

usándose rutinariamente; sin embargo, las técnicas de biología molecular han permitido un diagnóstico de patógenos altamente específico y una detección de variantes patogénicas eficiente.

Los objetivos de este estudio fueron caracterizar morfológica y molecularmente hongos aislados de frutos en postcosecha asociados a síntomas de antracnosis en aguacate; así como conocer las variantes patogénicas u otras especies presentes en un banco de germoplasma de aguacates que no son tratados químicamente para el control de enfermedades en la etapa de precosecha.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Patógenos en postcosecha de aguacate

Las enfermedades postcosecha ocupan un lugar importante en el grupo de enfermedades del aguacate, representando un serio problema en la calidad de la fruta. El factor común de estas enfermedades es que aparecen cuando el fruto comienza su ablandamiento. De esta forma, los primeros síntomas que presenta el fruto de aguacate en postcosecha son normalmente pudriciones que aparecen durante las últimas semanas de maduración, pero llegan a ser muy severos antes que el fruto alcance su madurez de consumo.

Los patógenos más frecuentes en postcosecha de aguacate reportados por Darvas y Kotzé (1981) son *Rhizopus stolonifer*, *Botryodiplodia theobromae* y *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*). Tamayo (2004) reporta a *Diplodia* sp., *Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *Fusarium* sp. y *Sphaceloma persea* como géneros que provocan pudrición en postcosecha.

2.2 La antracnosis como enfermedad postcosecha en aguacate

La antracnosis es la enfermedad más importante en postcosecha de frutos de aguacate, debido a que afecta directamente la comercialización del fruto.

El hongo fitopatógeno causante de esta enfermedad es *C. gloeosporioides*, responsable de la antracnosis en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Las regiones donde este hongo se ha identificado son Estados Unidos (Domergue *et al.*, 2000), Sudáfrica (Sanders y Korsten, 2003), Israel (Wattad *et al.*, 1994), Nueva Zelanda (Everett *et al.*, 2008), y México (Zamora *et al.*, 2001; Téliz y Mora, 2007; Rodríguez *et al.*, 2009).

La antracnosis en México se encuentra distribuida en todos los municipios donde se cultiva el aguacate, esta enfermedad causa daños desde el campo presentando síntomas denominados “viruela” y “clavo” que son manchas irregulares redondas de color café (Zamora *et al.*, 2001)., el hongo afecta al fruto en cualquier etapa de desarrollo, traslado, almacenaje y comercialización. La infección se ve favorecida con una humedad relativa de 85-90% y temperaturas de 25 °C en campo, aunando la falta de aeración en los huertos (Morales *et al.*, 2009).

El proceso de infección se da a través de las esporas de *C. gloeosporioides* que se dispersan por el viento, lluvia, insectos, herramientas u otros animales que invaden a los frutos en diferentes estados fenológicos (Morales, 2000; Téliz y Mora, 2007). El hongo sobrevive en brotes tiernos, frutos momificados, ramas y hojas afectadas (Morales *et al.*, 2009).

Los síntomas aparecen hasta que el fruto comienza a madurar, debido a que en frutos inmaduros el hongo permanece en latencia o en estado apresorio causado por compuestos antifúngicos (1-acetoxi-2-dihidroxi-4-oxo-heneicosa-

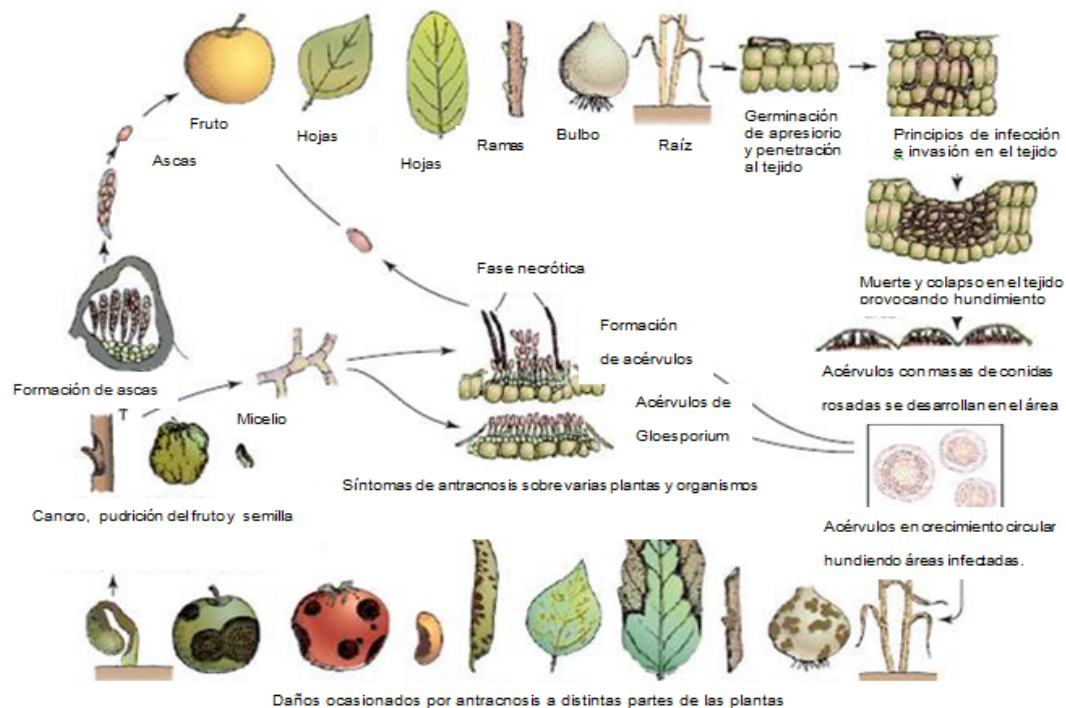
12,15 dieno y el 1-acetoxi-2,4-diifrx-i-n-heptadec-16-enoque) (Zamora, 2001). Inicialmente, los síntomas aparecen como lesiones circulares pequeñas de color café claro y cuando la lesión se alarga, se torna hundida en el centro, cambia a color café oscuro o negro. Bajo condiciones de humedad, aparecen masas de esporas de color salmón en el centro de las lesiones. La infección severa se presenta durante los meses de junio, julio y agosto ya que están asociados con la época de lluvia, y menor grado en febrero y marzo cuando se presentan lluvias ocasionales (Morales *et al.*, 2009). Los conidios dentro de los acérvulos, mismos que son la fuente principal del inoculo, son adheridos al hospedero por medio de una capa compuesta de polisacáridos y glucoproteínas presentes en dichas estructuras (Téliz y Mora, 2007)

2.2.1 Agente causal de la antracnosis

Colletotrichum es uno de los géneros más importantes de los hongos patogénicos en postcosecha en todo el mundo, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales (Bailey y Jeger, 1992).

De acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América (NCBI, 2010), *C. gloeosporioides* pertenece al reino Fungi; phylum Ascomycota; clase Sordariomycetes; subclase Sordariomycetes incertae sedis; orden Phyllachorales; familia Phyllachoraceae; género *Glomerella*; especie *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld y H. Schrenk (fase teleomórfica, sexual o perfecta) o *Colletotrichum gloeosporioides* (fase anamórfica, asexual o imperfecta).

Muchas especies de *Colletotrichum* establecen inicialmente la infección a través de una breve fase biotrófica, asociada con la formación de una larga hifa primaria que actúa de forma intracelular. Seguido de este mecanismo ocurre la fase necrótica; en esta etapa se forma una hifa angosta secundaria que se ramifica a través del tejido afectado (Prusky *et al.*, 2000). En la figura 1 se puede observar el ciclo de la antracnosis causada por el género *Colletotrichum*.



Fuente: Agrios, 2005

Figura 1. Ciclo de la antracnosis por *Colletotrichum*, *Glomerella cingulata* o *Gloesporium*.

Colletotrichum muestra un crecimiento lento *in vitro* (Sreenivasaprasad y Talhinhas, 2005). Las colonias presentan coloraciones de gris claro a gris oscuro; sin embargo, en agar avena el micelio es blanco, poco algodonoso, y posee masas conidiales de color naranja en papa-dextrosa agar; en agar agua y agar avena pueden observarse la formación de apresorios.

El hongo posee hifas septadas y produce apresorios clavados, ovalados, algunas veces lobulados, melanizados de color café (Téliz y Mora, 2007), cuyas dimensiones varían de 4 a 12 μm de longitud (Sutton, 1992).

2.3 Técnicas moleculares para la identificación de especies

La diversidad genética en hongos puede ser evaluada con la observación con diferentes características morfológicas como el color, características de micelio como forma, aspecto, septos y consistencia. Algunos de estos caracteres son muy estables, pero la mayoría varía con mucha facilidad ya que son fuertemente influenciados por el medio ambiente donde se encuentren. Por lo anterior, la certeza de las clasificaciones basadas en dichas características es un poco ambigua y poco confiable.

Gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales. Esto ha permitido el desarrollo de metodologías rápidas, objetivas y aplicables a un gran número de muestras, así como, el diseño de primers específicos, para la detección y caracterización de diversos hongos patógenos de plantas en cultivos de importancia económica. Algunos de ellos son *Colletotrichum* (Freeman y Rodríguez, 1995; Prusky *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2002, Maharaj y Rampersad, 2011), *Fusarium* (Stewart *et al.*, 2006) *Aspergillus* (Batista *et al.*, 2008), *Alternaria* (Kusaba y Tsuge, 1995) y levaduras (Vaughan-Martini *et al.*, 2005).

Una serie de técnicas moleculares de gran desarrollo en los últimos veinte años permiten conocer la información genética que los organismos poseen. Dichas técnicas se conocen en forma genérica como marcadores moleculares y

funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma. Son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana. Permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del DNA entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo.

2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR (Polymerase Chain Reaction) es un método revolucionario que fue desarrollado por Kary Mullis en 1985 (Weising *et al.*, 2005). Se trata de una tecnología *in vitro* que se utiliza para sintetizar fragmentos específicos de DNA, con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés a partir de una muestra compleja. Para tal fin, se utiliza una polimerasa que puede actuar a temperaturas muy elevadas ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79 a 85 °C) (Valadez y Kahl, 2005).

La reacción se lleva acabo con oligonucleótidos que contienen un grupo OH extremo 3' libre, que es complementario con la cadena molde del DNA.

Los “oligos o iniciadores” funcionan como punto de inicio para la adición de nucleótidos y para copiar la cadena molde en el PCR. Una vez que el oligonucleótido se une a su blanco, la DNA polimerasa puede seguir extendiendo la hebra complementaria.

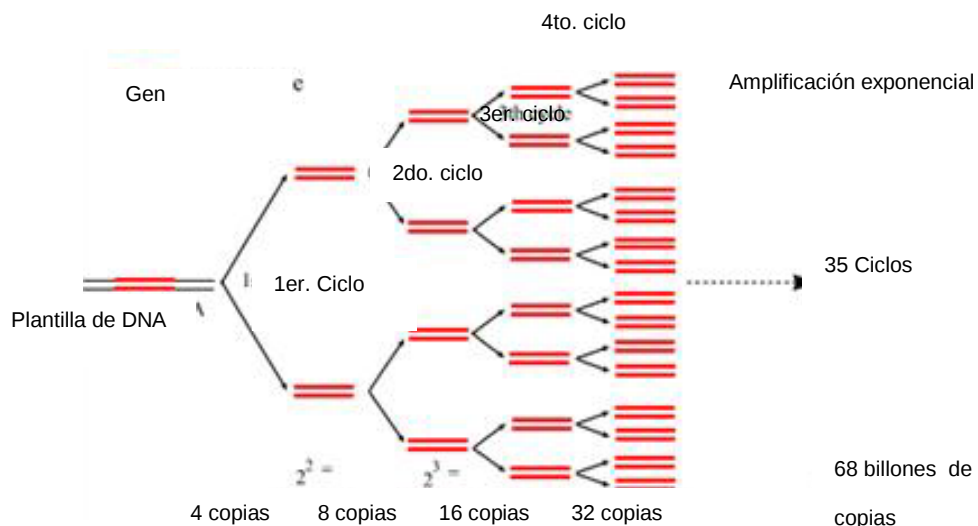
El número de copias del fragmento de DNA que se encuentra entre los dos oligonucleótidos se amplifica de acuerdo con los ciclos de reacción. Cada ciclo de una reacción de PCR consta de tres pasos (Edel, 2005; Valadez y Kahl, 2005).

1.- Desnaturalización: separa mediante temperatura de 96 °C la molécula doble de DNA a cadenas sencillas que servirán como moldes para la síntesis del fragmento en estudio.

2.- Alineamiento: reconocimiento de las moléculas iniciadoras a la secuencia blanco del DNA molde. Las moléculas iniciadoras pueden variar en longitud, composición de bases nitrogenadas y especificidad para aparearse con la secuencia blanco y de esto depende la temperatura a utilizar. La temperatura de alineamiento puede variar de 25 a 65 °C.

3.- Extensión: en esta última fase se hace una extensión o alargamiento de la molécula iniciadora mediante la enzima DNA polimerasa a 72 °C.

En la figura 2 se muestra la representación gráfica del proceso de PCR que incluye un último paso de extensión final, en donde se completa la síntesis de todos aquellos fragmentos que quedaron incompletos durante el termociclaje (Vierstraete, 1999).



Fuente: Vierstraete, 1999.

Figura 2. Representación gráfica de la PCR.

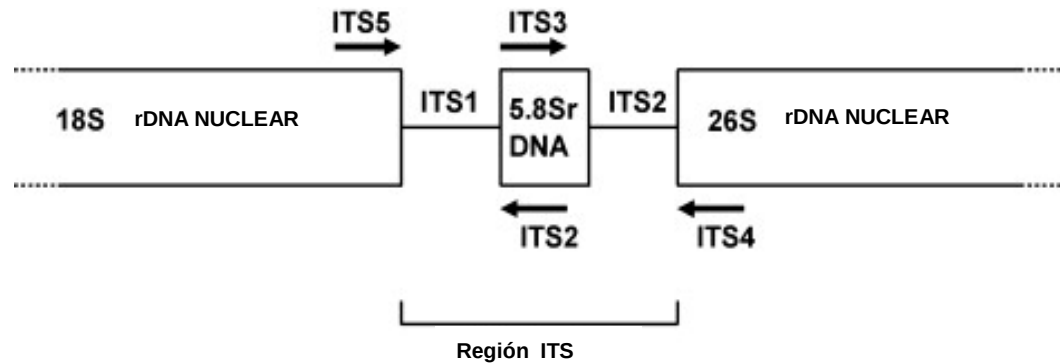
Teóricamente n ciclos de PCR permiten una amplificación de 2^n fragmentos de DNA. Una reacción de PCR suele llevar de 30 a 40 ciclos. Todos los componentes están presentes desde el inicio de la reacción, y el procedimiento de la amplificación es automatizado con programación de calentamiento y enfriamiento (Edel, 2005).

2.3.2 Espacio transcrito interno (ITS)

La región del espaciador interno transcrito (ITS), que se encuentra en el DNA nuclear entre la zona de los genes ribosomales 18 y 28 S, es un marcador genético versátil y se ha utilizado en los eucariotas, incluidos los organismos tan diversos como los protozoos, plantas, vertebrados y hongos.

Dicho marcador es útil para la construcción de árboles filogenéticos, la estimación de las estructuras genéticas de población para evaluar los procesos evolutivos a nivel de población y en la determinación de la identidad taxonómica (Powers *et al.*, 1997).

En la figura 3 se muestra la región espaciadora interna transcrita (ITS) del rDNA nuclear que contiene dos regiones variables no codificadoras ITS-1 e ITS-2, que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas de rDNA entre la subunidad pequeña (5.8S) y los genes que codifican para rRNA la subunidad grande (LSU) y la subunidad pequeña (SSU).



Fuente: Baraket *et al.*, 2008

Figura 3. Región espaciadora interna transcrita.

Los genes del RNAr de los eucariontes conocidos como rDNA, se encuentran como unidades repetidas que están arregladas en tándem, localizados en sitios del cromosoma conocidos como regiones del organizador nuclear (NORs) conteniendo al menos 30000 copias por célula (Sharman *et al.*, 2006; Baraket *et al.*, 2008).

La estructura del operon rDNA contribuye a su amplia aplicabilidad, se divide en dominios que evolucionan a ritmos diferentes, por lo que esta región puede ser utilizada para tratar los problemas de diagnóstico evolutivo en diferentes niveles de divergencia. El rDNA es un componente repetitivo de la familia del genoma de DNA nuclear, y la presencia de múltiples copias de estos genes en el genoma facilita la amplificación por PCR. La diversidad intraespecífica en el rDNA nuclear es común en hongos.

En esta región, estudios de polimorfismo para varias especies fúngicas han mostrado que el rDNA nuclear es adecuado para el análisis de la relación genética a nivel de género y especie (Powers *et al.*, 1997).

2.3.3 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de DNA (RFLPs), involucran la detección de un segmento específico (marcador molecular) en el DNA de estudio por hibridación con un fragmento marcado radiactivamente de secuencia complementaria al marcador (Valadez y Kahl, 2005).

La determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, cuando es cortado por enzimas de restricción. De esta forma, en un gel de electroforesis aparece un patrón de bandas polimórficas correspondientes a los fragmentos de diferentes tamaños, que se generan con el corte de cada endonucleasa. Estos fragmentos polimórficos aparecen debido a que los organismos de diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje o corte para cada enzima de restricción (Obrerá, 2004).

Actualmente, el uso más frecuente de los RFLP es una combinación con la PCR, conocida como RFLP-PCR. Con esta técnica se amplifican fragmentos específicos del DNA por PCR y luego son tratados con endonucleasas de restricción para obtener los patrones específicos.

Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis. Los productos de la PCR del rDNA muestran elevada variación longitudinal para las diferentes especies (Gomes 2002; Obrerá, 2004).

2.3.4 Secuenciación de ácidos nucleicos

Los análisis más detallados de diferenciación de DNA pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos. Hasta hace poco tiempo, el uso extenso de secuencias de DNA para los estudios de poblaciones no habían sido prácticos porque los fragmentos de DNA para cada individuo tenían que ser aislados para construir librerías de DNA subgenómico después de haber sido identificados por hibridización. Sin embargo, actualmente el uso de secuencias es muy común; se ha aplicado en análisis de genética de poblaciones y problemas taxonómicos.

En el presente, la secuenciación es un procedimiento es relativamente fácil gracias al desarrollo de equipos automatizados de electroforesis capilar. Estos producen una serie de moléculas que difieren en longitud por un nucleótido, indicando mediante fluorescencia la última base modificada adicionada en la cadena, con la cual se determina la secuencia del fragmento original (Church, 2006). El método enzimático propuesto por Sanger en 1980 fue el que se consideró para desarrollar esta estrategia con bastante eficiencia y consiste en marcar el oligo cebador o los terminadores con un compuesto fluorescente y activar la reacción de secuencia.

Los productos de la reacción se detectan directamente durante la electroforesis al pasar por delante de un láser que al excitar los fluoróforos permite detectar la fluorescencia emitida.

3.- OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

- Identificar morfológica y molecularmente especies de hongos patógenos asociados con síntomas de antracnosis en frutos de aguacate.

3.2 Objetivos Particulares:

- Caracterizar morfológicamente los hongos aislados de frutos de aguacate en postcosecha.
- Utilizar PCR-RFLP para identificar las cepas aisladas.
- Secuenciar la región ITS (ITS 5HP-ITS 4B) de los aislamientos de hongos de frutos de aguacate en postcosecha.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colección de muestras

Se colectaron muestras de frutos de 12 variedades de aguacate (*Persea anmericana*) con síntomas característicos de antracnosis. El muestreo se realizó en el banco de germoplasma de Coatepec de Harinas, Estado de México.

Cuadro 1. Ubicación de las variedades de aguacate procedentes del banco de germoplasma de la fundación Sánchez Colín

VARIEDAD	PARCELA
Hass Jiménez	El filtro
Bacon	Cerca parcela filtro
Amarillo	Entrada al rancho
Charly	
Ariete	Entrada al rancho
Sujeto 2PF2	Entrada al rancho
Colín V33	Terrazas uno
Sujeto 3 PF2	Entrada al rancho
Fuerte	Punta A
Encinos	Hilera camino
Pionero	Vega 3
Reed	Vega 3
55 PV2	Vega 3

Los frutos traídos de campo se lavaron y se suspendieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 min para desinfectarlos y después se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se secaron con papel estéril. Se colocaron en cámara húmeda para facilitar el desarrollo del patógeno a temperatura ambiente $\pm 25^{\circ}\text{C}$ y se observaron diariamente durante 8 días.

El aislamiento se realizó, después de la incubación, hasta que los frutos presentaron síntomas de antracnosis asociados a lesiones oscuras y hundidas, circulares o elipsoidales con grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosada como se observa en la Figura 4.



Figura 4. Fruto con síntomas de antracnosis

4.2 Obtención del patógeno

De cada uno de las 12 variedades de aguacate, se tomaron cinco trozos de tejido sintomático, se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % por 3 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y secaron.

Los tejidos se sembraron en cajas petri con agar-papa-dextrosa (PDA, DIFCO®) y se incubaron a 27 °C por 5 d (Agrios, 2005).

La purificación de los aislamientos se realizó mediante cultivos monoconidiales; para los hongos que presentaron poca o nula esporulación se utilizó la técnica de punta de hifa. Los aislamientos se mantuvieron en cajas Petri con medio PDA y se transfirieron a medio fresco aproximadamente cada tres semanas.

4.3 Caracterización morfológica

Una vez purificados los hongos, se tomaron discos de medio de cultivo con micelio (5 mm de diámetro), se colocaron individualmente sobre placas de PDA, se mantuvieron en cámara de incubación a 27 °C. De cada aislamiento se registró la forma de crecimiento, presencia o ausencia de conidios y el tipo de micelio. El color de cada aislamiento se midió directamente en caja petri con el colorímetro Hunter Lab MiniScan XE Plus (45/0-I), usando la escala CIE Lab.

El crecimiento micelial se midió diariamente hasta que el hongo llenó la caja Petri. Con los datos de crecimiento se realizaron regresiones lineales para la obtención de tasas de crecimiento micelial (TCM).

4.4 Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad de los aislamientos se realizaron en frutos de aguacate de cada variedad. Se aplicó tratamiento térmico a 53 °C por 3 min para reducir la carga de contaminación de campo.

Posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 5 min para desinfectarlos superficialmente, después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel estéril. Cinco frutos se inocularon por contacto directo en cuatro perforaciones realizadas entre el exocarpio y mesocarpio, con la ayuda de una aguja de disección a una profundidad de 0.3 cm. La misma cantidad de micelio se colocó en cada una de las perforaciones. Este procedimiento se realizó con cada uno de los hongos y se mantuvo un tratamiento testigo (cinco frutos). Los frutos se colocaron en cámara húmeda a 25 °C±. El diámetro y la profundidad del tejido infectado se midieron a los 10 d y se hicieron reaislamientos en cultivo puro para su identificación y comprobar los postulados de Koch.

4.5 Caracterización molecular del patógeno

4.5.1 Extracción de DNA

El DNA se extrajo empleando el método de CTAB 2% (Weising *et al.*, 2005), con algunas modificaciones. Con la ayuda de una espátula se colectó la mayor cantidad posible de micelio y se transfirió a un mortero donde fue macerado con nitrógeno líquido. La mezcla se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL, y se agregó 1 mL de CTAB, se mezcló por inversión y se incubaron en baño maría por 90 min a 65 °C en agitación constante. Posteriormente, a cada tubo se agregaron 500 µL de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), se mezclaron por inversión durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm en una centrífuga Eppendorf a 4 °C por 10 min. El sobrenadante formado se transfirió a un tubo nuevo cuidando de no romper la interfase y se agregó 0.5 volumen de isopropanol frío, se mezclaron suavemente por inversión y se incubaron a -20 °C por 1 h para que se precipitara el DNA. Trascurrida la hora, los tubos con DNA precipitado se centrifugaron a 13, 200 rpm por 30 min. El sobrenadante se decantó cuidadosamente para no perder la pastilla formada.

La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 70 % y los tubos se centrifugaron por 8 min a 13, 200 rpm; esta actividad se repitió dos veces más para aquellas pastillas que presentaron residuos mucilaginosos.

Los tubos permanecieron invertidos al menos 30 min hasta que las pastillas se secaron. Posteriormente, a cada tubo se le adicionaron 50 µL de agua estéril grado HPLC y se mantuvo a 4 °C.

La calidad e integridad de DNA se determinó en geles de agarosa al (0.8 %). La concentración de DNA se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). De cada muestra de DNA

se hicieron diluciones para ajustar la concentración a $20\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ y realizar las amplificaciones con PCR.

4.5.2 Amplificación por PCR-RFLPs de la región de ITS

Para realizar estudios de taxonomía y filogenia de especies se han desarrollado técnicas mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Estos estudios consisten en el análisis de un gen o de una región del genoma, como el ITS que se encuentra repetidamente entre los genes del RNA ribosomal de la subunidad mayor y menor del DNA nuclear. Estas regiones pueden ser amplificadas mediante el uso de primers o iniciadores universales o específicos.

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores ITS 5HP (5'–GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG–3') y NL4 (5'–GGTCCGTGTTTCAAGACGG–3').

Cuadro 2. Mezcla de PCR por muestra donde; 1. Concentración del Stock de cada uno de los reactivos empleados, 2. Volumen tomado del stock para cada reactivo, 3. Total de cada concentración presente en 25 μ L de la mezcla de reacción, 4. Concentración final de los reactivos en 25 μ L, 5. Volumen de reactivos para una reacción de 12 muestras.

Reactivo	[] stock ¹	μ L 1 x ²	Total ³	[] Final ⁴	μ L 12 x ⁵
Agua libre de nucleasas	-----	3.95		-----	47.4
Buffer	10 X	2.5		1X	30
Iniciador F	10 pM μ L	2		20 pM	24
Iniciador R	10 pM μ L	2		20 pM	24
dNTP's	1 mM μ L	5		200 pM	60
Mg Cl₂	50 mM	1.25		2.5 mM	15
	μ L				
Taq polimerasa	5 U μ L	0.3		1.5 U	3.6
DNA	20 ng μ L	3		60 ng	36
Volumen total de reacción	25			250	

Las muestras se amplificaron en un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos (95 °C por 1 min; 58 °C por 1 min; 72 °C por 1.5 min), finalmente un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min.

Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con amortiguador de corrida tris-acetato-EDTA (TAE) a 90V durante 45

min; las imágenes fueron documentadas empleando el programa Quantity One (BioRad).

Para caracterizar con RFLP los fragmentos de ITS de los hongos obtenidos con el par de iniciadores IT5/NL4, se digirió el fragmento de 1200pb obtenido en la PCR con las siguientes enzimas: *HaeIII* (Fementas®), *HhaI* (Fementas®) y *HinfI* (Fementas®), conforme las especificaciones del proveedor. Se utilizaron 10 µL de producto de PCR, 18 µL de agua libre de nucleasas, 2 µL de buffer R y, por último, 2 µL de la enzima correspondiente por muestra. Finalmente se mezclaron suavemente e incubaron a 37 °C durante 24 hrs.

El producto de digestión se visualizó en geles de acrilamida en una cámara vertical C.B.S. Scientific CO® modelo MVG-216-33 con una fuente de poder E-C Apparatus Corporations®, Modelo EC-105. Los cristales de la cámara se limpiaron con etanol al 70 % y papel Kim Wipes® procurando que no hubiese residuo de ningún tipo, los cristales se ensablaron para formar el sándwich; dos por cámara. En un aplicador se midieron 22 mL de poliacrilamida (Acrilamida-Bisacrilamida 29:1 [p/p] al 40 % [p/v], 11 mL de TBE 10X, 77mL de agua destilada estéril, 65 µL de TEMED [N', N', N', N'- Tetramethylenediamine]) SIGMA® y 440 µL al 25 % de Persulfato de amonio (p/v) SIGMA®; la mezcla se agitó manualmente por dos segundos y se agregó a los cristales hasta unos 4 cm antes del tope, se colocaron los peines de 50 pozos y enseguida se llenaron los cristales cuidando que no quedara ninguna burbuja de aire.

Los cristales se ensamblaron a la cámara 30 min después de la polimerización, se agregó buffer de corrida TBE 1X, se retiraron los peines y se lavaron los

pozos bombeando buffer de corrimiento. Posteriormente, los pozos se cargaron con 5 μ L de la reacción. Las muestras se corrieron a 245 voltios por 1.20 hrs.



Figura 5. Montaje del gel de acrilamida al 8 %.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se desmontó del sistema y se sumergió durante 10 min en solución fijadora (etanol 10 %, ácido acético 1 %) en agitación constante. Después, el gel se enjuagó con agua destilada estéril y se adicionó la solución de tinción (nitrato de plata 0.2%) durante 5 min. Posteriormente se retiró el nitrato de plata, se añadió la solución reveladora (hidróxido de sodio al 3%) y 500 μ L de formaldehído por cada 500 mL de solución, manteniendo el gel en agitación hasta el revelado de bandas. Una vez que las bandas se visualizaron, el gel se sumergió nuevamente en la solución fijadora (Smabrook *et al.*, 1989).

En los geles se incluyeron los marcadores de peso molecular de 100 pb (invitrogen®) con la finalidad de estimar el peso molecular de los fragmentos de digestión obtenidos.

4.6 Secuenciación de DNA

4.6.1 Limpieza de las amplificaciones

Para el proceso de secuenciación, es necesario realizar la limpieza de las amplificaciones que consiste en degradar los nucleótidos e iniciadores remanentes de la PCR. Este proceso se llevó a cabo con la enzima EXO-SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase y Exonuclease 1) de acuerdo a las especificaciones del proveedor (Promega®), utilizando 2 µL de la enzima ExoSAP-IT, y 5 µL producto de PCR. La mezcla se incubó durante 15 min a 37 °C y posteriormente 15 min a 80 °C. Enseguida se cuantificó la concentración de DNA y se preparó una dilución para lograr una concentración 0.2 µg mL⁻¹

4.6.2 Reacción de secuenciación

Para la amplificación de la región ITS 1, 5.8S e ITS2 se utilizaron los iniciadores ITS 4B (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') e ITS 5HP (5'–GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG–3') que permitieron la obtención de un fragmento de 750 pb. la reacción de secuenciación se hizo con el Kit Terminator Ready Reaction V3.1 (Applied Biosystems) con las especificaciones que se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Determinación de la cantidad de reactivo utilizado en la secuenciación del gen ITS.

Reactivo	Final	1 x	0.25 x
Mezcla de reacción	---	8 µL	2 µL
Terminato			
Templado/ pGEM	10 ng/µL ⁻¹	1 µL	1 µL
Iniciador	0.8 pmol	4 µL	4 µL
Buffer 5x	---	3 µL	3 µL
Agua MiliQ	---	4 µL	10 µL
Volumen Final		20 µL	20 µL

Las condiciones de termociclaje fueron de un ciclo inicial de desnaturalización inicial a 96 °C por 10 s, 35 ciclos (96 °C por 10 s; 50 °C por 5 s), finalmente, un ciclo de extensión final de 60 °C por 4min. Se empleó el secuenciador 3130x Applied Biosystems.

4.7 Análisis estadístico

4.7.1 Caracterización morfológica

Las características morfológicas y culturales de cada aislamiento como forma de la colonia, color, tipo de micelio, tasa de crecimiento (TCM), patogenicidad y reaislamientos positivos utilizados para comprobar los postulados de Koch, se utilizaron para hacer un análisis de componentes principales con el objetivo de transferir un problema de información estadística muy compleja en otro

equivalente pero más manejable (pocas nuevas variables) sin pérdida significativa de información.

El ACP comprende un procedimiento matemático que transforma un conjunto de variables originales, o la matriz de varianzas-covarianzas en su defecto, en un conjunto menor de variables no correlacionadas llamadas componentes principales (CP). Estos componentes acumulan una parte de la varianza total; entre mayor sea su valor propio describe mayor variabilidad, siendo el primer componente el que más variabilidad describe y así subsecuentemente (Jhonson, 1998). Este procedimiento es utilizado para datos cuantitativos y mixtos.

4.7.2 Caracterización molecular

4.7.2.1 Análisis de los fragmentos obtenidos por RFLP-PCR

Los fragmentos obtenidos del marcador ITS del hongo se analizaron de acuerdo con el método informado por Nuñez-Colín y Valadez-Moctezuma (2010) mediante el software FreeTree con 500 remuestreos, el árbol conceso se visualizó en Tree View (Page, 2001).

El remuestreo se empleó con el objetivo de tener una mayor confiabilidad de los agrupamientos generados en el dendrograma.

4.7.2.2 Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de los genes empleados para cada microorganismo, se editaron empleando los programas Finch Tv 1.4.0, Mega 4.1., que permiten alinear las secuencias obtenidas. Posteriormente se realizó una comparación con las secuencias reportadas en el GenBank mediante el programa BLAST, se realizó un alineamiento de todas las secuencias, para obtener como resultado una secuencia consenso.

El agrupamiento de las secuencias de los genotipos se realizó mediante el programa MEGA 4 utilizando el coeficiente de similitud de Neighbor Joining o vecino más cercano.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

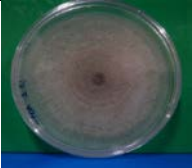
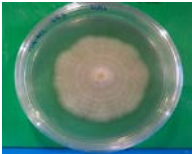
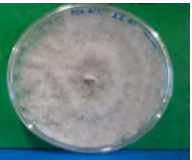
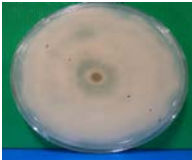
5.1 Colección de las muestras por variedades y obtención del patógeno

El patógeno se aisló de frutos con síntomas de antracnosis que presentaron las características que muestra la Figura 6.



Figura 6. Frutos de aguacate con síntomas de antracnosis.

Se registraron las características culturales de cada aislamiento que se reportan en la Figura 7.

Variedad	Fruto	Aislamiento	Características culturales
Hass Jiménez			Micelio blanco, con relieves, conforme crece el micelio cambia a color verde y forma masas de esporas color naranja.
Bacon			Micelio de coloración amarilla, con relieves.
Amarillo Charly			Micelio aéreo de color verde oscuro de crecimiento rápido
Ariete			Micelio de color blanco y conforme crece cambia a color amarillo
Sujeto 2PF2			Micelio blanco aéreo con el crecimiento cambia a color verde oscuro. De crecimiento rápido.
Colín V-33			Micelio blanco aéreo con el crecimiento cambia a color verde oscuro. De crecimiento rápido.
Sujeto 3PF2			Micelio blanco aéreo con el crecimiento cambia a color verde oscuro. De crecimiento rápido.
Fuerte			Micelio de color amarillo, raso y con relieves.

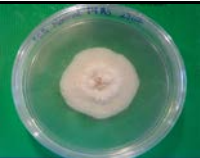
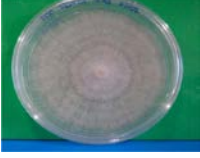
Encinos			Micelio en forma de roseta de color amarillo crecimiento lento
Pionero			Micelio blanco aéreo con el crecimiento cambia a color verde oscuro. De crecimiento rápido
Reed			Micelio de color rosado con relieves circulares.
55PV2			Hongo de crecimiento lento, de color rosado.

Figura 7. Colección de muestras de aguacate de diferentes variedades con sus aislamientos y características morfológicas.

5.2 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se muestra en el Cuadro 4 de acuerdo a las variables analizadas que presentaron las cepas aisladas de cada variedad de aguacate.

Cuadro 4. Características morfológicas de los aislamientos obtenidas de cada variedad de aguacate.

Variedad de aguacate	Forma de la colonia	Color de la colonia	Tipo de micelio	Tasa de crecimiento (cm/d)	Patogenicidad (% de severidad)	Reaislamiento postulados de Koch
Hass Jiménez	Radial	Gris	Aéreo	0.56	90	Positivo
Bacon	Radial	Salmón	Vegetativo	0.73	90	Positivo
Amarillo Charly	Ramificada circular	Verde oscuro	Aéreo	1.46	0	Positivo
Ariete	Radial	Amarillo	Vegetativo	0.73	0	Negativo
Sujeto 2 PF2	Ramificada circular	Verde oscuro	Aéreo	1.85	10	Positivo
Colín V-33	Ramificada circular	Verde oscuro	Aéreo	1.46	20	Negativo
Sujeto 3 PF2	Ramificada circular	Verde oscuro	Aéreo	0.73	0	Negativo
Fuerte	Radial	Salmón	Vegetativo	0.73	90	Positivo
Encinos	Radial	Amarillo	Vegetativo	0.52	0	Positivo
Pionero	Ramificada circular	Verde oscuro	Aéreo	1.46	80	Positivo
Reed	Radial	Rosa	Vegetativo	0.91	15	Positivo
55 PV2	Radial	Blanco	Vegetativo	0.60	0	Negativo

5.3 Análisis de componentes principales para las características morfológicas de los hongos

Para realizar el análisis de componentes principales se obtuvo así una interpretación mixta representada en el Cuadro 5. Las características fenotípicas se les asignó el dígito 2 para representar la presencia del carácter y el 1 para indicar la ausencia.

Cuadro 5. Matriz de datos con variables morfológicas de los aislamientos

Cepa	Forma de crecimiento ²	Tipo de micelio ³	TCM ¹ (cm)	Patogenicidad (% de severidad)	Postulados de Koch	Preseña de conidia	Escala de color		
							I	a*	b*
1	1	1	0.56	90	2	2	32.81	1.26	6.16
2	1	2	0.73	90	2	2	43.97	-2.82	16.34
3	2	1	1.46	1	2	1	5.26	2.03	2.43
4	1	2	0.73	1	1	1	66.75	-7.54	40.16
5	2	1	1.85	10	2	2	9.05	0.41	-9.41
6	2	1	1.46	20	1	1	29.47	2.13	6.39
7	2	1	0.73	1	1	1	43.93	2.01	9.68
8	1	2	0.73	90	2	2	45.81	-0.12	6.64
9	1	2	0.52	1	2	2	40.05	16.76	15.22
10	2	1	1.46	80	2	1	6.83	1.22	2.25
11	1	2	0.91	15	2	2	23.61	17.72	9.64
12	1	2	0.60	1	1	2	4.02	5.61	1.42

¹Tasa de crecimiento micelial

² 1= radial, 2 = ramificada

³ 1 = aéreo, 2 = vegetativo

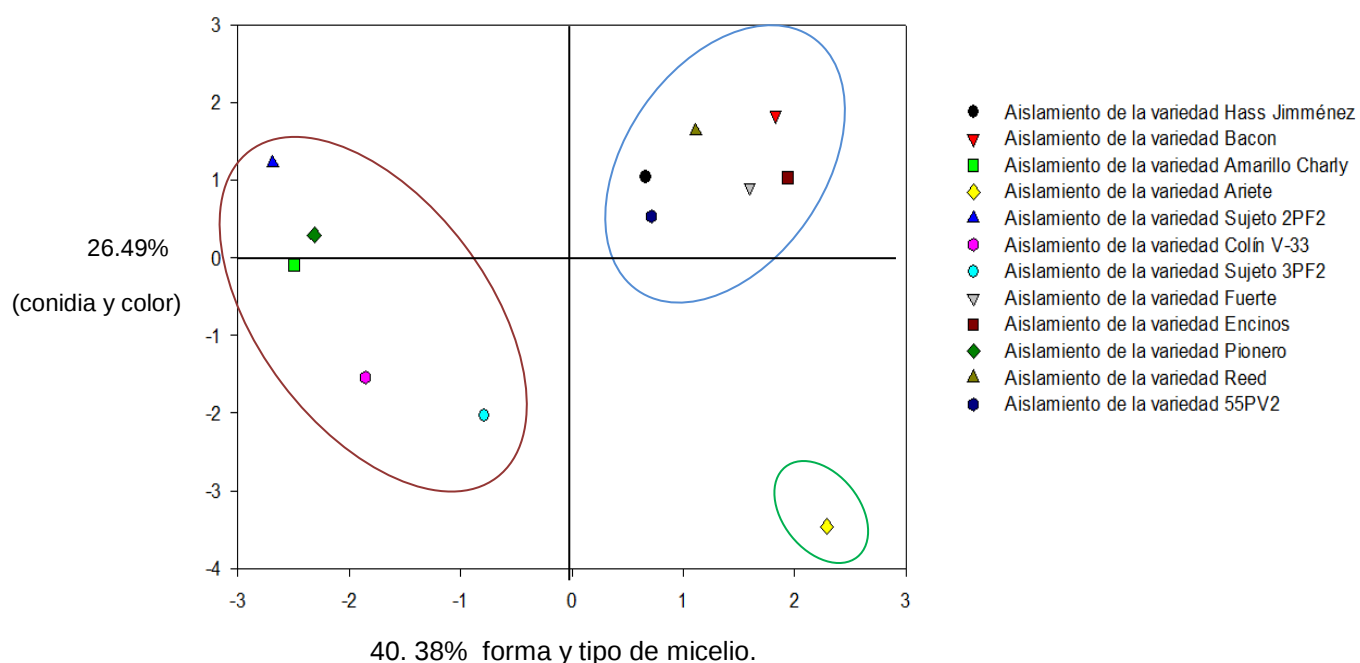


Figura 8. Representación gráfica del análisis de componentes principales.

El primer componente principal estuvo representado por la forma y el tipo de micelio ocupando el 40.38% de la varianza total. El segundo componente estuvo constituido por la presencia de colonia y el color.

En la Figura 8 se aprecia claramente la formación de tres grupos entre las cepas, el primero (A) está compuesto por los aislamientos de la variedad Amarillo Charly, Sujeto 2 PF2, Colín V-33, Sujeto 3.PF2 y Pionero, quienes se distinguen por presentar una forma de crecimiento ramificada circular y el micelio aéreo. Estas cepas se muestran en la Figura 9 y presentan una

coloración blanca en los primeros días de crecimiento y conforme se desarrollan, el color que las caracteriza es el verde oscuro. Los aislamientos que representan el grupo A de ACP se muestran en la Figura 9.

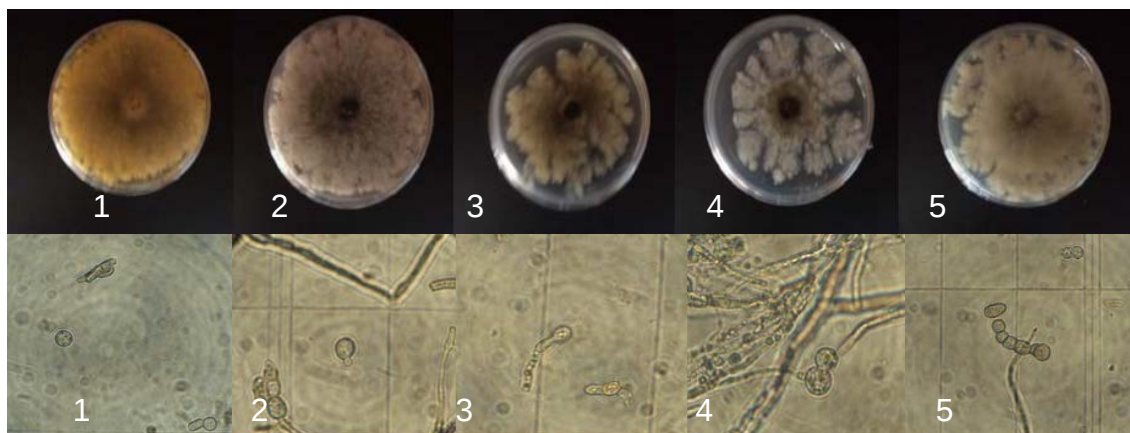


Figura 9. Cepas y conidas representantes del grupo A aislados de las variedades 1.- Amarillo Charly, 2. Sujeto 2PF2, 3. Colín V-33, 4. Sujeto 3PF2 y 5. Pionero.

Este grupo (A) presenta escasa o nula esporulación en medio PDA, ya que tarda hasta 30 días para producir algunas esporas.

El segundo grupo (B) que se muestra en la Figura 10, se integra en su mayoría de cepas con crecimiento radial y fueron aisladas de las variedades Hass Jiménez, Bacon, Fuerte, Encinos, Reed, y 55-PV2.

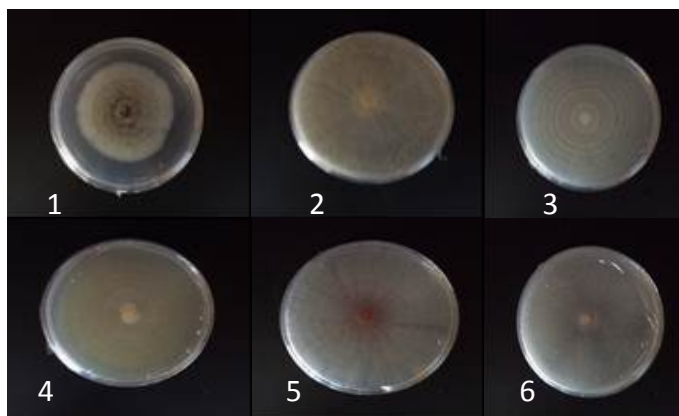


Figura 10. Cepas representativas del grupo B a 8 d de crecimiento en PDA aisladas de las variedades 1. Hass Jiménez, 2. Bacon, 3. Fuerte, 4. Encinos, 5. Reed, y 6. 55-PV2.

Estas cepas presentan micelio vegetativo y presencia de conidios. Dentro de este grupo se encuentra la cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* aislada de la Var. Hass Jiménez este hongo crece lentamente en medio PDA (14 d) y coincide con lo reportado por Sreenivasaprasad y Talhinhas (2005). De igual forma el hongo presenta una coloración blanca a gris conforme se desarrolla, lo cual es reportado por Freeman *et al.* (1998) en aislamientos de aguacate, en el cual los autores reportan que la forma y el color entre especies de *Colletotrichum* pueden variar considerablemente y señala diferencias entre aislamientos de *Colletotrichum acutatum* de almendras

de california, los cuales presentaban una coloración roja a salmón al reverso de la caja Petri. De acuerdo con lo anterior, la coloración es una característica morfológica que puede causar confusión entre estas especies. Los hongos aislados de las variedades que se encontraron en el grupo B tienen una coloración crema, a excepción de las cepas aisladas de las variedades Reed y 55 PV2 que presentan una coloración rosada a lila conforme se desarrollan. Los conidios presentes en este grupo se muestran en la Figura 11.

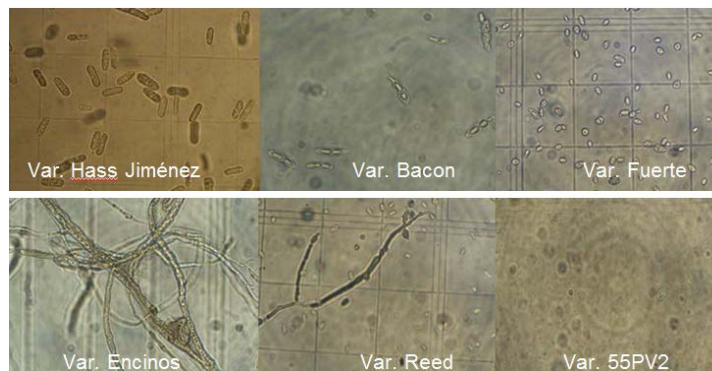


Figura 11. Conidias de ocho días de crecimiento en PDA de la var. Hass Jiménez, Bacon, Fuerte, Encinos, Reed, y 55PV2

El aislamiento de la variedad Hass Jiménez corresponde a *Colletotrichum gloeosporioides* de acuerdo con las claves de Barnett y Hunter (1998).

La cepa aislada de la Variedad Bacon es reportada como *Fusarium*, al igual que los aislados de la variedad Fuerte y Reed de acuerdo con la forma de los conidios.

Debido a la diferencia que existe entre conidios, así como en el color del micelio, se hizo necesaria la identificación molecular para aquellas cepas que sólo desarrollaron micelio. El análisis de componentes principales nos mostro dos grandes grupos que de acuerdo con sus características se trata de dos especies diferentes; no obstante, en el segundo grupo pudimos observar a través de los conidios que dentro de esa agrupación también hubo especies diferentes.

Finalmente, sólo uno de los aislamientos se mantuvo separado se muestra en la Figura 12. Este hongo forma el tercer grupo del ACP, cuyas características distintivas fueron coloración amarilla, crecimiento radial y presencia de conidios.

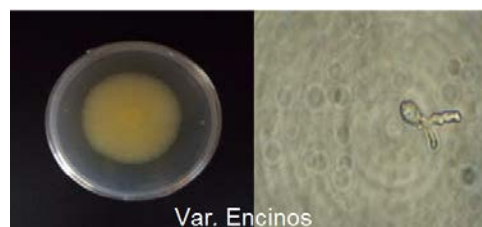


Figura 12. Cepa y conidia representativa del grupo 3 (C) con 8 d de crecimiento en PDA aislada de la variedad Ariete.

Las características de la forma de crecimiento de la colonia y velocidad de crecimiento no son lo más satisfactorio para la descripción de estas especie debido principalmente a la variabilidad de estas características en *C. gloeosporioides* . Por lo anterior, se procedió a realizar la caracterización molecular de las cepas.

5.4 Caracterización molecular

5.4.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA a través del método de CTAB presentó concentraciones que variaron de 33.96 ng μL^{-1} a 766.71 ng μL^{-1} y la concentración varió de 1.17 a 2 ng μL^{-1} . En la figura 13 se aprecia la electroforesis de la calidad del DNA de los 12 aislamientos de los hongos fitopatógenos.

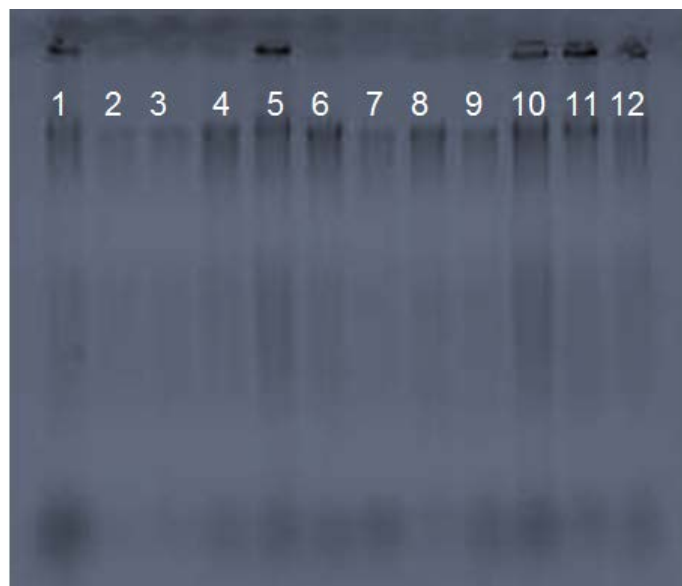


Figura 13. Electroforesis en agarosa 0.8% de DNA de doce cepas de hongos aislados de diferentes variedades de aguacate (1. Hass Jiménez, 2. Bacon, 3. Amarillo Charly, 4. Ariete, 5. Sujeto 2PF2, 6. Colín V-33, 7. Sujeto 3 PF2, 8. Fuerte, 9. Encinos, 10. Pionero, 11. Reed, 12. 55PV2)

5.4.2 Amplificación por PCR de la región ITS y RFLPs

Los RFLPs han sido ampliamente utilizados para tipificar todo tipo de microorganismos, además de la comparación de especies (Abang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011; Maharaj y Rampersad, 2011; Ramdeen y Rampersad, 2012).

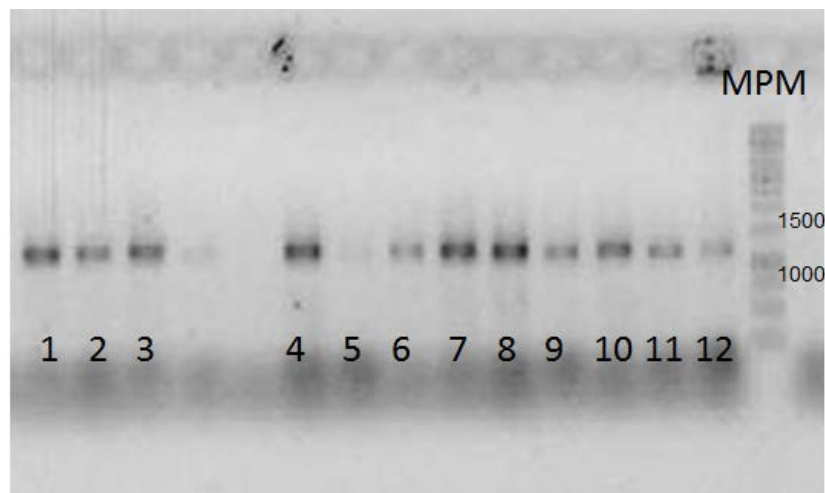


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1.2 % de los productos de ITS amplificados con los iniciadores ITS5HP-NL4. Marcador de peso molecular (MPM) de 1 Kb GeneRuler™. (1. Hass Jiménez, 2. Bacon, 3. Amarillo Charly, 4. Ariete, 5. Sujeto 2PF2, 6. Colín V-33, 7. Sujeto 3 PF2, 8. Fuerte, 9. Encinos, 10. Pionero, 11. Reed, 12. 55PV2)

La región ITS amplificada a partir de los 12 aislamientos de los hongos con los iniciadores utilizados. En la Figura 14 se muestra que se amplificó un fragmento de aproximadamente 1200 pb en todos los aislamientos.

Los patrones de restricción, generados a partir del fragmento ITS, presentaron polimorfismos al cortarse con las enzimas (*Hae* III, *Hha* I y *Hinf* I) que reconocieron y cortaron el DNA en secuencias muy específicas (sitios de

restricción), por lo que generaron fragmentos diferentes.

La variación observada entre las muestras de DNA en el tamaño de los fragmentos es lo que se conoce como RFLP y es una consecuencia de los cambios heredables en el DNA como mutaciones puntuales que crean o suprimen sitios de restricción, los cuales pueden ser observados con electroforesis.

La electroforesis es una técnica comúnmente empleada para la separación, identificación y purificación de moléculas de ácidos nucleicos. Se basa en el hecho de que estas moléculas están cargadas negativamente y migran hacia el ánodo en un campo eléctrico. La electroforesis del ADN usualmente se realiza en una matriz de agarosa o poliacrilamida, inmersa en un buffer salino que permita el establecimiento de un campo eléctrico (Paterson, 1996).

Los fragmentos de restricción que generaron los RFLPs se observaron fácilmente en geles de acrilamida al 8 % en la Figura 15. Cada banda hace referencia a un sitio específico donde la enzima realiza el corte del fragmento ITS.

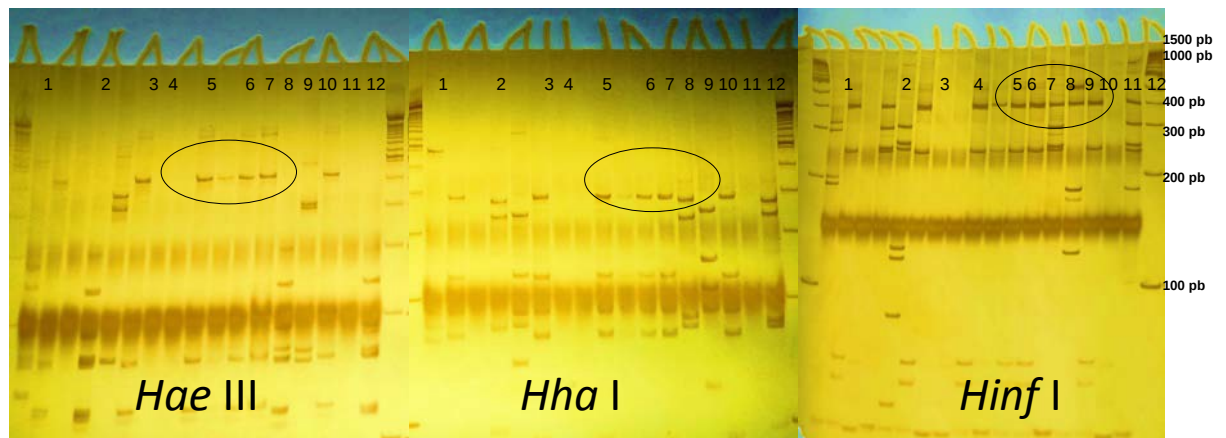


Figura 15. Fragmentos de restricción producidos por los cortes de las enzimas Hae III Hha I y Hinf I. Los carriles de los extremos corresponden al marcador de peso molecular de 100pb de Fermentas®. (1. Hass Jiménez, 2. Bacon, 3. Amarillo Charly, 4. Ariete, 5. Sujeto 2PF2, 6. Colín V-33, 7. Sujeto 3 PF2, 8. Fuerte, 9. Encinos, 10. Pionero, 11. Reed, 12. 55PV2).

Los fragmentos localizados en la elipse de cada enzima de la figura 14 corresponden a las misas cepas que conforman el grupo A del análisis de componentes principales y muestran perfiles muy parecidos. Se infiere que pudiera tratarse de la misma especie. Cada gel nos muestra cortes a diferentes tamaños, lo cuales al sumar los de una misma cepa, nos da un aproximado de 1200 pb en adelante, los se muestran en el Cuadro 6, 7 y 8 de acuerdo al tipo de enzima.

Cuadro 6. Tamaño estimado en pares de base (pb) de los cortes realizados por la enzima *Hae* III

Genotipo	Marcadores de <i>Hae</i> III							Tamaño de fragmeno
	a	b	c	d	e	f	g	
1. Hass Jimenez	290	250	190	175	160	150		1215
2.- Bacon	310	250	190	170	150	140	130	1340
3.- Amarillo Charly	550	170	135	130	85			1070
4.- Ariete	250	195	190	175	170	140	130	1250
5.- Sujeto 2PF2	550	175	140	130	90			1085
6.- Colín V-33	550	175	140	130	90			1085
7.- Sujeto 3PF2	550	175	140	135	95			1095
8.- Fuerte	330	250	200	180	175	135	125	1395
9.- Encinos	450	420	180	175				1225
10.- Pionero	550	175	150	140	95			1110
11.- Reed	390	190	180	175	170	150		1255
12.- 55PV2	330	250	205	195	180	175	150	1485

Durante la electroforesis, los fragmentos de menor tamaño corren más rápidamente que los fragmentos mayores y de este modo la posición relativa de los fragmentos en el gel depende del tamaño de los mismos.

Cuadro 7. Tamaño estimado en pares de base (pb) de los cortes realizados por la enzima *Hha I*.

Genotipo	Marcadores de <i>Hha I</i>								Tamaño de fragmeno
	a	b	c	d	e	f	g	h	
1. Hass Jimenez	600	190	180	170					1140
2.- Bacon	400	380	180	95	85	70			1210
3.- Amarillo Charly	400	350	240	190	175	90	70		1515
4.- Ariete	400	250	190	185	180	170			1375
5.- Sujeto 2PF2	400	360	240	175					1175
6.- Colín V-33	400	240	190	175	90	70			1165
7.- Sujeto 3PF2	400	240	190	175	90	80			1175
8.- Fuerte	380	350	280	190	180	80			1460
9.- Encinos	360	275	210	190	130				1165
10.- Pionero	400	240	190	175	90	80			1175
11.- Reed	600	350	250						1200
12.- 55PV2	380	360	280	190	180	95	90	80	1655

Cuadro 8. Tamaño estimado en pares de base (pb) de los cortes realizados por la enzima Hinf I.

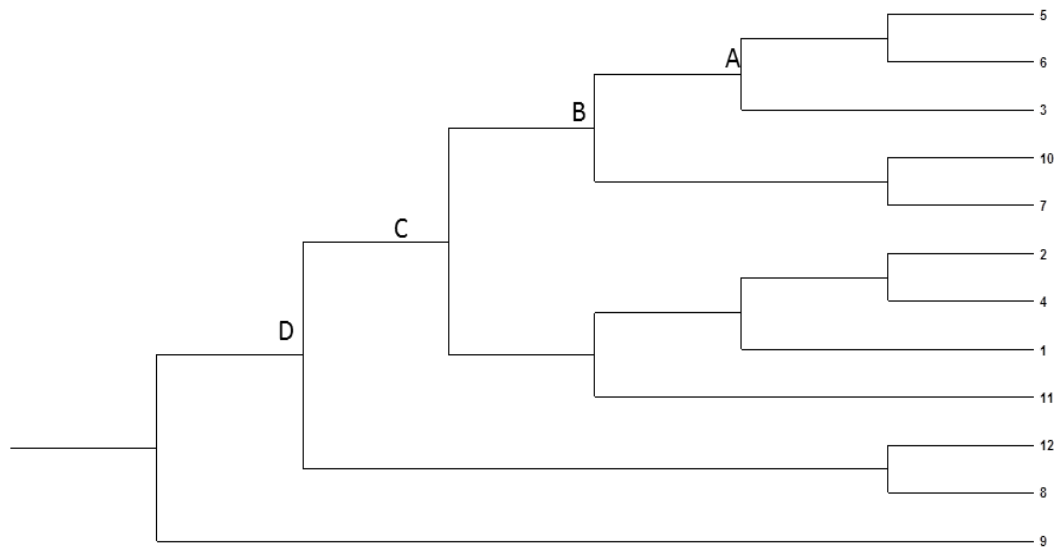
Genotipo	Marcadores de <i>HinfI</i>						Tamaño de fragmeno
	a	b	c	d	e	f	
1. Hass Jimenez	400	320	300	200	190	20	1430
2.- Bacon	400	300	255	250	20		1225
3.- Amarillo Charly	500	400	250	50	40	20	1260
4.- Ariete	350	300	200	195			1045
5.- Sujeto 2PF2	500	400	250	50	40	20	1260
6.- Colín V-33	500	400	250	50	40	20	1260
7.- Sujeto 3PF2	500	400	250	50	40	20	1260
8.- Fuerte	400	300	290	270	250	20	1530
9.- Encinos	550	400	185	170	120	20	1445
10.- Pionero	550	400	250	50	40	20	1310
11.- Reed	410	400	310				1120
12.- 55PV2	400	300	270	185	20		1175

El más amplio uso que se le ha dado a la técnica de RFLP ha sido en estudios de identificación y filogenia, utilizando la región del rDNA 5,8S y los espaciadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2 (5,8S – ITS).

La región 5.8S es codificadora y conservada, muestra baja variabilidad intraespecífica que no permite la delimitación entre cepas de una misma especie; sin embargo las zonas de los ITS que flanquean el gen 5.8S, son dos regiones no codificantes e hipervariables que permiten el reconocimiento a nivel interespecífico (ver Figura 3).

Para tener mayor confiabilidad en los grupos conformados por los RFLPs, los datos de la matriz binaria se remuestrearon 500 veces (bootstrap) con el software FreeTree. El remuestreo de los datos genera pseudo muestras que son evaluadas en alineamientos secuenciales. Durante el remuestreo se toman al azar columnas o variables del alineamiento hasta alcanzar la longitud del alineamiento original; de esta manera algunas columnas o filas aparecerán en más de una ocasión, mientras que en otras no aparecerán en los remuestreos individuales. Normalmente se recomienda remuestrear al menos 100 veces, dependiendo del número de muestras a evaluar y la longitud del alineamiento. En este caso, las muestras están representadas por la cantidad de individuos y el número de bandas de DNA (marcadores) de cada individuo; mientras que la longitud del alineamiento corresponde al tamaño de la matriz original; es decir, número de bandas por número de individuos. Si se tiene más de 100 bandas o 100 individuos, se recomienda hacer por lo menos 1000 remuestreos; es decir, se va remplazando cada vez una variable y se vuelve a construir el dendrograma, y en los árboles obtenidos se representa el porcentaje de variación respecto al dendrograma original con todas las variables, pudiendo tener diagramas de consenso (Nuñez-Colín y Valadez-Moctezuma, 2010). El dendrograma obtenido se muestra en la Figura 16.

Figura 16. Dendrograma obtenido con el método de remuestreo bootstrap del software Free Tree a partir del perfil de restricción generado con PCR-RFLP de la región de ITS de las 12 cepas de hongos fitopatógenos.



La caracterización genotípica con RFLPs de los doce aislamientos de aguacate utilizando el fragmento ITS permitió formar 4 grupos (A, B, C y D); el primero estuvo conformado por los aislamientos 5 (Sujeto 2PF2), 6 (Colín V-33), 3 (Amarillo Charly), 10 (Pionero) y 7 (Sujeto 3 PF2) que coinciden con las características del análisis morfológico y presentan un coloración verde oscura, micelio aéreo y crecen en forma ramificada con una tasa de crecimiento micelial en promedio de 1.39 cm por día, es decir presentan un crecimiento rápido a comparación de los demás aislamientos.

El segundo grupo estuvo formado por los aislamientos 2 (Bacon), 4 (Ariete), 1 (Hass Jiménez) y 11 (Reed), estos coinciden en la forma de crecimiento radial y en la presencia de conidios abundantes; sin embargo difieren en color entre cepas; el hongo 2 presenta una coloración crema con formación de acervulos a los 12 días de crecimiento, el hongo 1 es de coloración blanquecina y conforme se va desarrollando se oscurece y toma una coloración gris; el hongo 4 es de coloración amarilla y a diferencia del análisis morfológico que no perteneció a ningún grupo, aquí se encuentra asociada al segundo grupo. El tercero estuvo compuesto por las cepas 12 (55PV2) y 8 (Fuerte), que crecen de forma radial pero difieren en coloración la cepa 8 presenta una coloración cremosa y la 12 una coloración rosa. Finalmente a la cepa 9 (Encinos) que no se agrupa directamente con otra cepa, pero que se relaciona con el segundo y tercer grupo; esta cepa tiene forma de crecimiento radial y coloración amarilla y difiere incluso morfológicamente de todos los demás.

5.5 Análisis de secuencias

Aunque los RFLP proporcionaron información confiable y agruparon los aislamientos con mayor precisión respecto al análisis morfológico; la secuenciación fue el último paso de la caracterización molecular de los aislamientos en el estudio, y permitió conocer la especie a la cual pertenecen cada uno de los hongos postcosecha encontrados en frutos de aguacate.

Los resultados de cada secuencia son proporcionados en diferentes archivos: AB1, pdf, txt, scf y phd. Si embargo, se utilizaron aquéllos con extensión AB1 y txt el primero muestra un electroferograma (Figura 17) y el segundo corresponde a la lectura de bases que realizó el secuenciador.

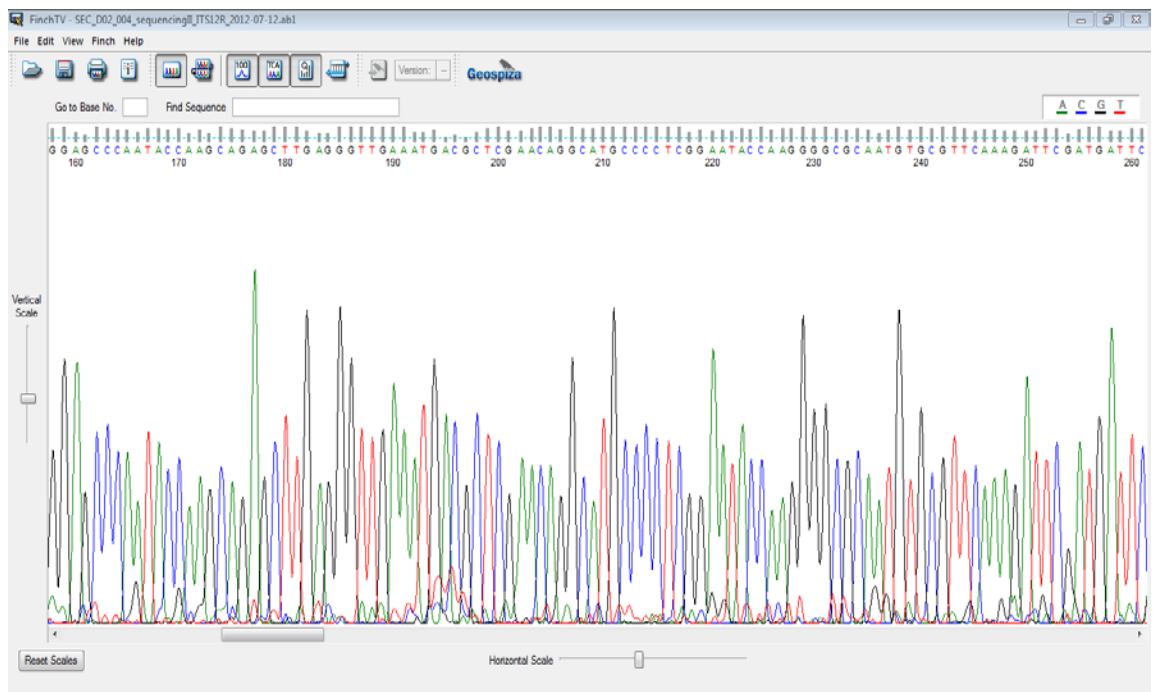


Figura 17. Electroferograma generado con el secuenciador 3130x Applied Biosystems.

El Sistema Applied Biosystems 3130 es un Analizador Genético de DNA mediante electroforesis capilar totalmente automático desde la carga de la muestra hasta su análisis. El sistema dispone de un sistema automático de

llenado y alineamiento de los cuatro capilares, de inyección automática y de software de análisis específico. Los electroferogramas obtenidos se analizaron y se alinearon para secuencia consenso que se muestra en la Figura 18.



Figura 18. Secuencia consenso de DNA de los aislamientos

Con esta información se realizó una comparación en el BLAST (Altschul et al; 1997) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que dio como resultado cuatro especies diferentes, que se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. . Relación de secuencias reportadas en el NCBI para los aislamientos de aguacate con síntomas de antracnosis.

Aislamiento /variedad de aguacate	Accesion	Descripción reportada en el NCBI	% de Similitud
Bacon	JX270181.1	Fusarium cf. solani 23879	93
Amarillo Charly	EU856062.1	Neofusicoccum arbuti isolate B62-07	99
Ariete	FJ904831.1	Glomerella cingulata strain Gr212	96
Sujeto 2 PF2	FJ478128.1	Fusarium solani strain xsd08086	99
Colín V-33	EU856062.1	Neofusicoccum arbuti isolate B62-07	99
Sujeto 3 PF2	EU856062.1	Neofusicoccum arbuti isolate B62-07	99
Fuerte	EU750678.1	Fusarium sp. 08025	98
Encinos	EF031114.1	Fungal sp. W262	100
Pionero	EU856062.1	Neofusicoccum arbuti isolate B62-07	99
Reed	FR731133.1	Fusarium oxysporum 1166	99
55 PV2	AF178399.1	Fusarium sp. NRRL 22178	99

Finalmente, el resultado obtenido de las secuencias de ITS (5.8S e ITS2) de cada uno de los hongos aislados muestran información relevante respecto a las 11 cepas consideradas, formando cuatro grupos diferentes. El primero compuesto por *Fusarium* con una lectura promedio de 500pb y este a su vez con tres especies que son *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium sp.* El segundo integrado por el género *Neofusicoccum arbuti* con un total de cuatro aislamientos y una lectura promedio de 510 pb en cada secuencia. El tercero compuesto sólo por un aislamiento de la especie *Glomerella cingulata* y por último un aislamientos de la especie *Fungal sp* con lecturas promedio de 450 pb y 510 pb, respectivamente, en cada secuencia.

Con la finalidad de comparar esta información se realizó un dendrograma (Figura 19) con las secuencias de los tres primeros grupos de los aislamientos por especie y se comparó con secuencias del GenBank.

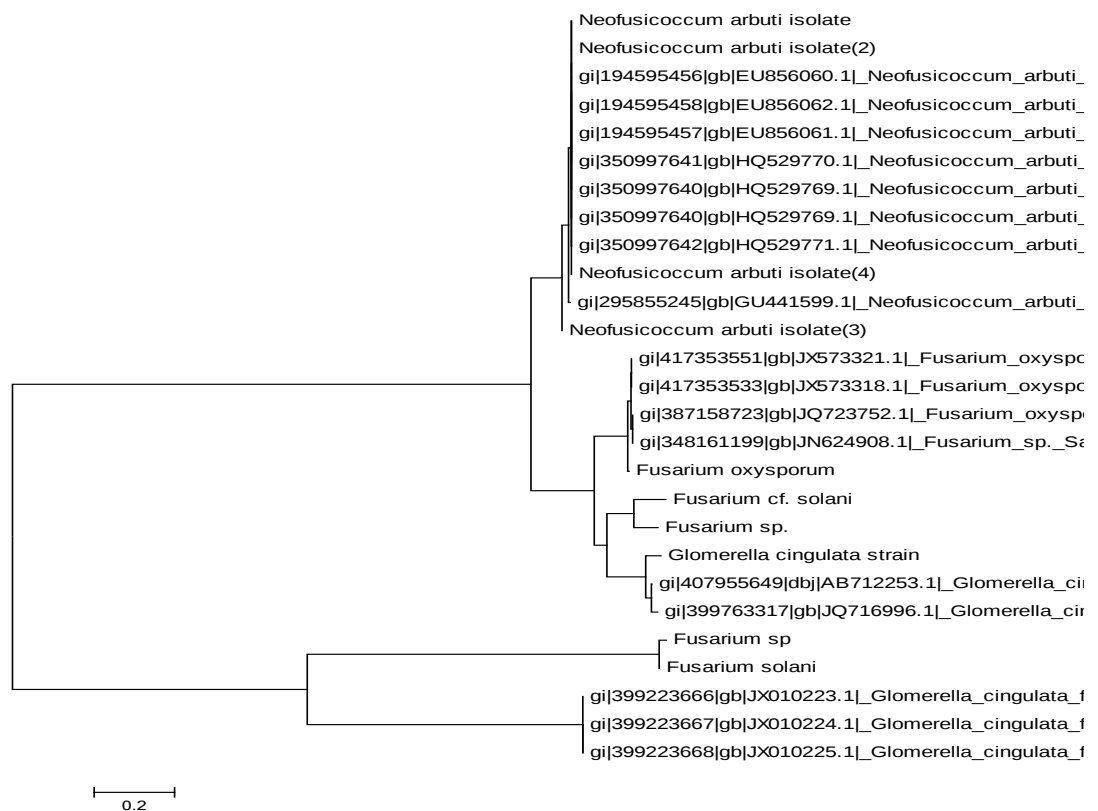


Figura 19. Filograma construido con el coeficiente de similitud Neighbor joining utilizando secuencias de ITS de los genotipos de *Fusarium* sp, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Neofusicoccum arbuti*, *Glomerella cingulata* y *Fungal* sp. aislados de aguacate.

Los resultados de secuenciación de la zona ITS de los hongos aislados de frutos de aguacate fueron contrastantes respecto a lo que se esperaba. Teóricamente, se esperaba aislar especies del género *Colletotrichum* o variantes del mismo como los agentes causales de los síntomas de antracnosis en los frutos; sin embargo, el filograma generado, así como el respectivo alineamiento blast en el GenBank indican que los hongos pertenecen a diferentes especies, tales como *Neofusicoccum arbuti*, *Fusarium sp.*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Glomerella cingulata*, pero no *Colletotrichum*. Investigaciones previas realizadas por diferentes investigadores indican que los hongos aislados e identificados en esta investigación son causantes de enfermedades relacionadas con pudriciones. En California se reportan especies causantes de cancro en aguacate pertenecientes a la familia de Botryosphaeriaceae como *Neofusicoccum australe*, *lúteo N.*, *N. parvum*, *Neofusicoccum sp.*, *Aesculi Fusicoccum* y *Dothiorella ibérica* (Eskalen y McDonald, 2011).

Moral *et al.*, (2010), reporta que *Neofusicoccum* pertenece a la familia de Botryosphaeriaceae y se trata de patógenos comunes que causan pudrición en frutas y muerte regresiva en las plantas leñosas. El análisis de secuencias pertenecientes a *N. arbuti*, especies aisladas de las variedades de aguacate Amarillo Charly, Sujeto 3PF2, Colín V-33 y Pionero, muestran un 100 % de homología con la base de datos del GenBank (HQ5229770) por McDonald y

Eskalen (2011). Estos investigadores mencionan especies de *Botryosphaeriaceae* asociadas con chancros en ramas de aguacate en California. De la misma manera presenta una homología del 100 % con las secuencias reportadas por Espinoza *et al.*, (2009) quienes reportan que Especies *Neofusicoccum* se encuentran asociados con cancro del tallo y muerte regresiva de arándanos en Chile.

Otra de las secuencias analizadas es la de *Fusarium*, que también se encuentra relacionadas con podredumbres y cancro. Ceja *et al.* (2000) encontró a *Fusarium esquisti*, *F. oxysporum* y *F. solani* como especies responsables de lesiones en los troncos de aguacate que producen manchas oscuras y presencia de polvo blanco en la superficie. El análisis de la secuencia de *F. oxysporum* aislado de la variedad de aguacate Reed, mostró 100 % de homología con las accesiones JX573321.1 y JX573318.1 reportadas en el GenBank por Sun y Guo (2012) que corresponden a aislamientos de hongos endófitos en las raíces de plantas de rosmarnifolia en Guangdong provincia de China. Así mismo, *F. oxysporum* también presenta una homología del 100% respecto a la accesión JQ723752.1 reportada por Eskalen *et al.* (2012) asociados a la muerte regresiva en aguacate en California. Este estudio revela que el hongo es transmitido por un insecto vector (*Euwallacea fornicatus*) y provoca la muerte en árboles de aguacate.

Otro de los aislamientos fue *G. cingulata* estado teleomorfo de *C. gloeosporioides*, el cual ha sido asociado con infecciones quiescentes y enfermedades en postcosecha sobre frutos tales como el aguacate, mango, papaya, maracuyá, guayaba, granadilla, cítricos, manzana y uva (Peres *et al.*, 2005). *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* pueden causar también pudrición peduncular, solo o en asociación con otros hongos (Ochoa *et al.*, 2007), por lo que se infiere que los aislamientos de *fusarium* estaban asociados en los frutos estudiados. Zauberman y Schiffmann (1975) reportaron a *F. solani* en frutos de aguacate causando infección durante el proceso de maduración, lo que provocaba que la tasa de respiración de la fruta se elevara y aumentara también la producción de etileno.

Lo reportado anteriormente deja ver que los hongos identificados en esta investigación han sido reportados previamente y de forma general en el árbol de aguacate. La importancia de nuestro estudio radica en que estas diferentes especies de hongos se aislaron e identificaron de frutos de aguacate en postcosecha; lo que nos deja ver en primera instancia, que los síntomas de antracnosis, causados por *Colletotrichum*, son similares a los que otras especies de patógenos pueden ocasionar y que son fácilmente confundibles.

En segundo lugar, las descripciones morfológicas o culturales de los hongos fitopatógenos en ocasiones puede no ser una fuente confiable para la identificación de especies, si no más bien es un complemento en el proceso de identificación.

Otro factor muy importante es la evaluación de la patogenicidad de los aislamientos ya que *F. solani* y *Fusarium. sp* aislados de las variedades de aguacates Bacon y Fuerte, así como *N. arbuti* aislado de la variedad Pionero presentan un porcentaje de severidad de 90 y 80 %, respectivamente. Esto sugiere que la forma en que actúan dichos hongos es degradando la pared celular a través de la secreción de enzimas y al igual que género de *Colletotrichum* causan pérdida total de los frutos cuando son infectados. Cabe mencionar que el banco de germoplasma de donde provienen los frutos es utilizado para conservar especies de aguacate y no es tratado con productos químicos. Esto permite que los patógenos presentes en el cultivo mantengan baja la actividad de sus genes de resistencia a los productos químicos y mantengan todos sus genes de virulencia o patogenicidad activos; es decir, que estos hongos tienen la capacidad de infectar fácilmente el fruto por sí mismos o actuar en conjunto con otros hongos. De acuerdo con los resultados, las especies de hongos aisladas son agresivos en frutos (por los daños que causaron en los frutos de aguacate durante el experimento de los Postulados de Koch); así como que en otras partes del árbol.

En el presente trabajo se utilizaron especies diferentes de aguacate; de las cuales se aislaron diferentes hongos; sin embargo, para poder confirmar lo anterior es necesario considerar genes específicos asociados a la patogénesis y evaluarlos en las diferentes partes de la planta, para obtener información relacionada y confiable sobre la forma en que actúan estos hongos fitopatógenos.

Por otro lado, el conocimiento de la presencia de hongos diferentes a *Colletotrichum*, causantes de problemas en la sanidad en frutos de aguacate postcosecha nos ayudará a desarrollar medidas de control más específicas, pues no hay seguridad de que los métodos actuales, para proteger a los frutos en condiciones de anaquel, sean suficientes para controlar a los hongos identificados.

6.- CONCLUSIONES

- Las especies de hongos fitopatógenos de mayor importancia en el banco de germoplasma fueron *Colletotrichum gloeosporioides* , *Glomerella cingulata*; *Fusarium* (*Fusarium* sp., *F. solani* y *F. oxysporum*) y *Neofusicoccum arbuti*.
- Las especies caracterizadas pertenecen a un grupo de patógenos causantes de pudriciones en pre y postcosecha de aguacate causando síntomas parecidos en el desarrollo de fruto y en las partes del árbol.
- La caracterización morfológica de las cepas aisladas coincidió con las distinciones a nivel molecular de las mismas; sin embargo, la primera no fue confiable para la identificación de especies debido a que algunos caracteres morfológicos son muy variables y se ven influenciados por el medio ambiente.

- Las especies aisladas e identificadas presentan la misma capacidad de patogenicidad que *Colletotrichum gloeosporioides* reportado como causante de antracnosis.
- El análisis de componentes principales permitió asociar a los hongos de acuerdo con sus características morfológicas y se relacionó con los grupos formados con los marcadores RFLP.
- Las técnicas moleculares fueron de gran utilidad para la identificación en lo particular con las cepas de *Neofusicoccum* ya que son cepas de hongos que presentan escasa esporulación.
- La secuenciación de DNA permitió asociar y hacer homologías de parentesco con especies reportadas en otras partes del mundo y en diferentes cultivos cantidades escasas. En lo particular con las cepas de *Neofusicoccum* son hongos que presentan escasa esporulación.
- La secuenciación permitió asociar y hacer homologías de parentesco con especies reportadas en otras partes del mundo y en diferentes cultivos.

7.- LITERATURA CONSULTADA

- Abang MM, Winter S, Green KR, Hoffmann P, Mignouna H D and Wolf G A (2002). Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. Plant Pathology 51(1) 63-71
- Agrios, G.N. 2005.Plant Pathology. 5th. Ed. Academic of Phytopathological Society Press, San Diego, C. A., E.E. U. U. p.p.3-922.
- Altschul, S. F., Madden T.L., Schaffer, Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman., 1997. Gapped BLAST (Basic Local Alignmet Search Tool) and PSI- BLAST: a new generation of protein databse search programs. Nuclei Acids Res. 25:389-3402.
- Alvarez E., Ospina C.A., Mejía J.F., Llano G. A., 2002. Caracterización morfológica patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el valle del Cauca. Fitopatología Colombiana. Vol. 28 N. 1.
- Bailey, J.A., and Jeger, M.J. 1992. Colletotrichum: biology, pathology and control. CAB International. Wallingford, U.K. 388 p.
- Baraket G, Saddoud O, Chatti K, Mars M, Marrakchi M, Trifi M, Salhi Hannachi A (2009a) Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.). Sci Hortic 120:34–40

- Barnett H.L. y Hunter B. B., 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Ed. Minnesota. APS Press. 218p.
- Batista B.B., Santos J. F. Oliveira N.T., Pires A. P. D., Motta C.M.S. y Lima L. A., 2008. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers, 2008. Genet. Mol. Res. 7 (3): 706-717
- Ceja-Torres, L. F., D. Téliz-Ortiz, S. Osada- Kawasoe., y J. L. Morales-García (2000). Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill, en cuatro municipios del estado de Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 18: 79-86.
- G.M. Church 2006. Genomes for ALL. Scientific American 294 (1): pp. 47-54
- Edel V., 2005. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. Cedex France.
- Eskalen,A., Gonzalez,A., Wang,D.H., Twizeyimana,M., Mayorquin,J.S. and Lynch,S.C. First Report of a *Fusarium* sp. and Its Vector Tea Shot Hole Borer (*Euwallacea fornicatus*) Causing *Fusarium* Dieback on Avocado in California. Plant Dis. 96 (7), 1070 (2012)
- Everett, K.R., 2003. The effect of low temperatures on *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing body rots of avocados in New Zealand. Aust. Plant Path. 32: 441-448.

- Everett K. R., Hallett C.I, Ress G. J. Chynoweth W. R. y Pak H, 2008. A. Avocado lenticel damage: The cause and the effect on fruit quality. *Postharvest Biology and Technology* 48: 383- 390.
- Chung W., Chung W., Peng M., Yang H. y Huang J., 2010. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. *New Biotechnology* 27 (1): 17-24.
- Darvas, J. M. y Kotzé, J. M., 1981. Control of *Cercospora* spot. *S. Afr. Avocado Grower's Ass. Yearbook* Vol. 4. 67 - 68
- Domergue F., Helms G. L., Prusky D. y Browse, 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* 54: 183-189.
- FAOSTAT (2010). Food and Agriculture Organization of the United Nations for a world without hunger. <http://faostat.fao.org/default.aspx>. Último acceso: 20 de octubre, 2012.
- Freeman S., Katan T. y Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates from Avocado and Almond Fruits with Molecular and Pathogenicity Tests. *Applied and environmental microbiology* 62 (3):1014-1020.

- Freeman, S., and Rodríguez, R. J. 1995. Differentiation of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose of strawberry by arbitrarily primed PCR. Mycol. Res. 99:501-504.
- Gomes A. E., Kasuya M. M. C., Barros G.E., Borges C. A. y Arujo F. E., 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. Genetics and Molecular Biology, 25, 4, 477-483.
- Janisiewicz W. J. y Korsten L., 2002. Biological Control of Postharvest Diseases of fruits. Rev. Phytopathol 40: 411- 441.
- Johnson D.E., 1998. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. International Thomson Editores.
- Kusaba M y Tsuge T., 1995. Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Appl Environ Microbiol. 1994 September; 60(9): 3055–3062.
- Liu, M., and Kolattukudy, P., 1999. Early Expression of the Calmodulin gene, which precedes appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, is inhibited by self-inhibitors and requires surface attachment. Journal of Bacteriology 181:3571-3577.
- Liu B., Louws F. J. Sutton T.B. y Correl C. J., 2011. A rapid qualitative molecular method for the identification of *Colletotrichum acutatum* and *C.*

gloeosporioides. Eur J Plant Pathol 132:593-607

- Maharaj A. y Rampersad S.N. Genetic Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* Associated with Anthracnose Disease of Papaya (*Carica papaya* L.) and Bell Pepper (*Capsium annuum* L.) Based on ITS PCR-RFLP Fingerprinting. Mol Biotechnol. 50:237249.
- McDonald, V. y Eskalen A., 2011. Botryosphaeriaceae Species Associated with Avocado Branch Cankers in California. Plant Dis. 95 (11), 1465-1473 (2012)
- McLaughlin, R.J., Wilson, C.L., Droby, S., Ben-Arie, R., Chalutz, E., 1992. Biological control of postharvest diseases of grape, peach and apple with the yeast *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. Plant Disease. 76: 470-473.
- Moualem B. D. y Prusky D., 2000. Early Events During Quiescent Infection Development by *Colletotrichum gloeosporioides* in Unripe Avocado Fruits. Biochemistry and Cell Biology 90 (5): 553-559.
- Moral J, Muñoz-Díez C, González N, Trapero A, Michailides TJ. 2010. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olives and other hosts in Spain and California. Phytopathology 100: 1340–1351
- Morales, G. J. L., 2000. La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) y la roña (*Spaceloma perseae* Jenk.) del aguacate en

Michoacán, México: epidemiología, predicción y caracterización. Tesis de Doctor en Ciencias. Instituto de Fitosanidad. Colegio de posgraduados. Montecillo, estado de México 137p.

- Morales G. J.L., Rodríguez G. M.P., Azpíroz R. H.S. y Pedraza S. M E., 2009. In vitro base temperature of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz isolated from avocado (*Persea Americana* Mill.) fruits cv. Hass in Michoacán, México. Revista UDO Agrícola 9 (2): 414-420. 2009
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). [en línea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Último acceso: 20/10/2012
- Nuñez-Colín, C. A. y Valadez-Moctezuma, E. 2010. Análisis estadístico de huellas genómicas. Un uso práctico de los paquetes computacionales más populares. Celaya, Guanajuato. México.
- Obrerá, R. T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoam. Micol. 21:15-19
- Peres N. A., L. W. Timmer, J. E. Adaskaveg, J. C. Correll, 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease 89:784-796
- Powers, Thomas O.; Todd, T. C.; Burnell, A. M.; Murray, P. C. B.; Flemming, C. C.; Szalanski, Allen L.; Adams, B. A.; and Harris, T. S., "The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes", 1997. Papers in Plant Pathology. Paper 239.

- Prusky, D., I. Koblitz, N. T. Keen, and J. J. Sims. 1992. Regulation of natural resistance of avocado fruit for the control of postharvest disease. Proc. Second World Avocado Congress. California, USA. pp: 479-484.
- Prusky, D., Wattad, C., Koblitz, I. 1996. Effect of ethylene on the activation of quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 864–868
- Prusky D., Freeman S. y Dickman M. B., 2000. *Colletotrichum* Host specificity pathology, and host pathogen interaction. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Page, R. D. M. 2001. Tree View versión 1.6.6. from <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>. Último acceso: 12/09/2012
- Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M. 2000. *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology, and Host- Pathogen Interaction. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 393 p.
- Rodríguez L.E., González P. J.M. y Mayek P. N. 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:53-63.

- Ramdeen S. y Rampersad S. N. Intraspecific Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato Based on In Silico Multilocus PCR-RFLP Fingerprinting. Mol Biotechnol. DOI 10.1007/s12033-012-9509-8
- Sambrook, J., Fritsch E.F. and Maniatis , T. 1989. Molecular cloning laboratory Manual, 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSH).
- Sanders G.M. y Korsten L., 2003. Comparison of cross inoculation potential of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. Microbiol. Res. 158: 143-150.
- Sanger, F., Nicklen. S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proceeding of the National Academy of Science USA 74: 5463-5467
- Sreenivasaprasad S., y Thalhinnhas P., 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a Cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. Molecular Plant Pathology 6 (4):361-378.
- Sharma, S., Rustdi, S., Balyan S. H. y Gupta, P. K., 2006. Inter transcribed Sapcer (ITS) sequences of ribosomal DNA of wild Barle And their comparison with ITS sequences in common whea T. Barley Genetics Newsleter vol. 32.

- SAS (versión 8.2, SAS Institute, Inc., Cary, NC).
- SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc. CA, EUA).
- Stewart JE, Kim M-S, James RL, Dumroese RK, Klopfenstein NB., 2006
Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* and *F. commune*
isolates from a conifer nursery. *Phytopathology* 96:1124–1133.
- Sun,S.S. and Guo,S.X., 2012. Isolation and Identification of Endophytic
Fungi in Roots of *Santalum album* L. and its host *Kuhnia rosmarnifolia*
Vent Plants Collected from Guangdong Province of China. GenBank:
JX573321.1
- Sutton, B. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*.
Biology, Pathology and control CAB international. Wallingford, pp. 1-26.
- Tamayo, P.J. 2004. Enfermedades poscosecha del aguacate y la
curuba. ASCOLFI Informa 30(5): 29-35
- Téliz O. D. y Mora A. A., 2007. El aguacate y su manejo integrado.Ed.
Mundi Prensa S.A. de C.V. 2a. Ed. 321p.
- Vaughan-Martini, A.; Kurtzman, C.P.; Meyer, S.A.; O'Neill, E.B. 2005.
Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp.
nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila*
comb. nov. *FEMS Yeast Research*. 5(4-5):463-469

- Wattad, D., Dinoor, A., and Prusky, D. 1994. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 7:293–297.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and G. Kahl. 2005. DNA Fingerprinting in Plants. Principles, Methods and Applications. 2nd. ed. CRC Press. USA. 444 p.
- Valadez E. y Kahl G., 2005. Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio), Mundi Prensa, Universidad Autónoma de Chapingo, D. F. México.
- Vierstraete, A. "Principle of the PCR." 11 Aug. 1999. University of Ghent. 6 Aug. 2008 <<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>.
- Zamora M. T., Cardenas S. E., Cajuste B.J.F., Colinas L.M.T., 2001. Anatomy of damage by friction and by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. in avocado fruit 'Hass'. *Agrociencia* 35: 237-244.
- Zauberman, G.; Schiffmann N.; Funch Y. y Yanko U. 1975. The biology and pathogenicity of fungi causing post-harvest rot of avocado fruit 30 (7/8): 499-502.

I.