

Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) en Michoacán, México

Cultural, morphological, pathogenic and isoenzymatic characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolates causing anthracnose on avocado (*Persea americana* Mill.) in Michoacán, México

José Luciano MORALES GARCÍA^{✉1}, Hilda Susana AZPÍROZ RIVERO² y Martha Elena PEDRAZA SANTOS¹

¹Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México y

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo Experimental Valle de México. km 18,5 Carretera Los Reyes-Lechería, Chapingo, Texcoco, México.

E-mails: jluciano@umich.mx y jluciano@prodigy.net.mx ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 31/01/2009

Fin de primer arbitraje: 17/03/2009

Primera revisión recibida: 27/08/2009

Aceptado: 28/08/2009

RESUMEN

Inspecciones fitosanitarias de huertos de aguacate cv. Hass en las diferentes zonas agroecológicas de Michoacán revelan variabilidad de síntomas atribuidos a *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. El objetivo fue detectar variantes de *C. gloeosporioides* mediante criterios morfológicos, culturales, patogénicos e isoenzimáticos. Se colectaron frutos de aguacate cv. Hass con síntomas de antracnosis, de viruela, con manchas superficiales café brillante y con cuarteaduras en la lesión en los municipios de Uruapan, San Juan Nuevo, Tancítaro, Peribán y Tacámbaro en Michoacán, México. El hongo *C. gloeosporioides* fue aislado de frutos de aguacate cv. Hass pero *Pestalotiopsis versicolor* (Speg.) Steyart también fue aislado de síntomas similares a los de antracnosis. Frutos en la etapa fenológica de madurez fisiológica fueron los más susceptibles a la infección de *C. gloeosporioides*. Se determinaron variantes (v) de *C. gloeosporioides* a partir de 42 cultivos monoconidiales, con base en los criterios siguientes: 1. Cultural: a) por la forma y color de la colonia: 11 v; b) por la velocidad de crecimiento de la colonia: 19 v; 2. Morfológico: a) por el tamaño de conidios: 23 v; b) forma del conidio: 4 v; 3. Patogénico: a) diámetro de las lesiones: 9 v, b) firmeza de la lesión: 6 v, c) peso de la pulpa invadida: 3 v, d) susceptibilidad a oxiclورو de cobre, maneb, thiabendazol y benomil: 17, 23, 5 y 7 v., respectivamente. 4. Isoenzimática: se diferenciaron 14 v de las cuales tres fueron sobresalientes, dos presentaron diferencia en 50% y una en 25% de los loci estudiados. El municipio de Uruapan presentó mayor número de variantes de *C. gloeosporioides*, seguido por San Juan Nuevo.

Palabras clave: Aguacate, antracnosis, *Colletotrichum*, *Gloeosporium*, *Pestalotiopsis*, isoenzimas, variantes.

ABSTRACT

Orchard phytosanitary inspections of avocado cv. Hass in different agroecological zones of Michoacán, Mexico revealed symptoms variability attributed to *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. The objective was to detect variants of *C. gloeosporioides* by morphological, cultural, isoenzymatic and pathogenic criteria. Fruits of avocado cv. Hass were collected with anthracnose symptoms, with glossy brown surface spots with cracks in the lesion in the municipalities of Uruapan, San Juan Nuevo, Tancítaro, Peribán and Tacámbaro in Michoacán, Mexico. The fungus *C. gloeosporioides* Penz was isolated from Hass avocado fruits but *Pestalotiopsis versicolor* (Speg.) Steyart was also isolated from similar spots. Fruits at the physiological maturation stage were most susceptible to *C. gloeosporioides* infection. *C. gloeosporioides* variants were determined from 42 monoconidial cultures, based in the following criteria: 1. Cultural: a) by the shape and color of the colony: 11 variants (v), b) by the growth rate of the colony: 19 v; 2. Morphological: a) by the conidial size: 23 v., b) by the conidial shape: 4 v.; 3. Pathogenic: a) diameter of the lesions 9 v.; b) firmness of the lesion: 6 v.; c) weight of the damaged flesh: 3 v.; d) susceptibility to copper oxichlorure, maneb, thiabendazol and benomyl: 17, 23, 5 and 7 v. respectively. 4. Isoenzymatic: a) by isoenzymes 14 v. were differentiated, three of them were outstanding (two presented a difference of 50% and one in 25% of the loci studied). Municipality Uruapan presented the greatest number of *C. gloeosporioides* variants, followed by San Juan Nuevo.

Key words: Avocado, anthracnose, *Colletotrichum*, *Gloeosporium*, *Pestalotiopsis*, isoenzymes, variants.

INTRODUCCIÓN

Inspecciones fitosanitarias de huertos de aguacate cv. Hass en las diferentes zonas agroecológicas de Michoacán revelan variabilidad de síntomas atribuidos a *C. gloeosporioides* Penz. (Morales, 1996). Estudios sobre la determinación de variantes de *C. gloeosporioides* en aguacate en México no existen. En el ámbito mundial se reporta a *C. gloeosporioides* Penz var. *minor* Simonds causante de la antracnosis del aguacate cultivar “Fuerte” en la costa de Australia (Fitzell, 1987). Aislamientos de frutos de aguacate con síntomas de antracnosis presentaron variación del color de las colonias, que contrastan con la descripción de colonias de color gris oscuro para *C. gloeosporioides*, así como la variación en tamaño y forma de los conidios que han servido para separar especies de *Colletotrichum* en fresa (Mordue, 1971).

Los síntomas de antracnosis dependen del órgano que es atacado y pueden ser ocasionados por tres especies de *Colletotrichum* y por el género *Gloeosporium* (Pamela y Douglas, 1992). Por otro lado, también se han observado diferentes respuestas en el control químico del hongo en el campo. Todo esto sugiere la variación genética de *C. gloeosporioides* en aguacate.

La finalidad de esta investigación fue detectar variantes de *Colletotrichum gloeosporioides* mediante criterios morfológicos, culturales e isoenzimáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron frutos de aguacate cv. Hass con síntomas de antracnosis, de viruela, con manchas superficiales café brillante y síntomas de antracnosis con cuarteaduras en la lesión (Figura 1) en los municipios de Uruapan, San Juan Nuevo, Tancítaro, Peribán y Tacámbaro en Michoacán, México. Las muestras de tejido enfermo se sembraron en PDA, a los dos días se reasilaron y se obtuvieron 26 aislamientos puros de *Colletotrichum gloeosporioides*. Los cultivos puros se colocaron en luz artificial continua por ocho días para inducir esporulación abundante. Posteriormente los conidios se diluyeron (10^{-1} a 10^{-9}) para obtener 42 cultivos monoconidiales.

Los criterios para diferenciar variantes entre los 42 cultivos monoconidiales fueron los siguientes:

Cultural

- a) Forma y color de la colonia. La descripción de esta característica se realizó visualmente cuando los hongos llenaron la caja Petri.
- b) Crecimiento de la colonia. Cada cultivo monospórico se colocó en cajas Petri. Una rodaja de 0,7 cm de diámetro de medio de cultivo PDA con micelio se incubó a 28°C; y el crecimiento de la colonia se midió cada 24 horas durante ocho días.

Morfológico

- a) Medición de conidios: Se midieron 100 conidios al azar. Se determinó el tamaño y la forma de los conidios

Patogénico

- a) Diámetro de la lesión. Frutos de aguacate del cv. Hass a tres cuartos de madurez fisiológica y sin síntomas externos se desinfestaron y se les hicieron tres perforaciones con un sacabocados esterilizado de 0.7 cm de diámetro. Con el mismo instrumento se extrajeron rodajas de medio de cultivo con micelio y se colocó en las perforaciones. Los frutos inoculados se colocaron en cámara húmeda. El diámetro de cada lesión se empezó a medir cada 24 hr a los cinco días de inoculados y se dejó de medir cuando las tres lesiones coalescieron.
- b) Firmeza de la lesión. Se midió 24 hr después de que las manchas de los frutos coalescieron; se empleo un texturómetro universal con un puntal de 250 g/10 s, (unidades en mm de penetración), colocado a 0,5 cm de distancia del borde del orificio donde se realizó la inoculación.
- c) Peso de la pulpa invadida. La cáscara de los frutos se separó a los 19 días después de la inoculación y la pulpa se pesó en una balanza analítica.
- d) Susceptibilidad a fungicidas *in vitro*: en el centro de una caja Petri con PDA se colocó una rodaja de 0,7 cm de diámetro de medio de cultivo con micelio; en forma de cruz, pegado a la orilla de la caja, se colocó un disco de papel filtro de 0,7 cm de diámetro saturado con cada fungicida (oxicloruro de cobre 3000 ppm, maneb 2000

ppm, benomil 700 ppm y thiabendazol 700 ppm con tres repeticiones cada uno); las cajas de Petri se introdujeron en una incubadora a 28,5°C y cada 24 hr se midió el desarrollo del micelio durante ocho días.

Isoenzimático

- a) Caracterización por isoenzimas. El micelio (50 mg) de cada uno de los 42 monoconidiales se colocó en tubos Eppendorf, adicionando 100 µl de Buffer de extracción. La muestra se licuó para romper las paredes de las células de las hifas del hongo, y se colocaron en un ultracongelador a -70 °C hasta que se utilizaron.

Para la preparación del gel se usó la técnica descrita por Goodman y Stuber (1988) con ligeras modificaciones. En uno de los extremos del gel se realizó un corte transversal para insertar las muestras. Para tomar las muestras de las alícuotas previamente descongeladas se introdujo una mecha de papel filtro

de 11 x 3 mm en cada microtubo, posteriormente con otro papel filtro se eliminó el exceso y se insertó en el corte practicado en el gel; de esta manera se colocaron 30 muestras por gel. En cada corrida frente al buffer se colocaron dos mechas con azul de bromofenol como marcador para observar el movimiento, y los 30 restantes se embebieron con las muestras. Al lado del gel donde se efectuó el corte se colocó un popote para asegurar buen contacto entre las dos secciones; la parte superior se cubrió con plástico y adicionalmente se enfrió con una bolsa o charola con hielo. De esta manera el gel se introdujo en la cámara fría, dentro de las cubas de electroforesis con el buffer para cada tipo de gel se llevó a cabo la corrida. El gel C se corrió a 175 V y 80 mA durante 7 horas, y el D a 250 V y 30 mA durante el mismo tiempo.

Al término de la corrida se procedió al revelado de los sistemas enzimáticos específicos de acuerdo con cada tipo de gel. Para el gel C: Alcohol deshidrogenasa (ADH), esterasa (EST), transaminasa

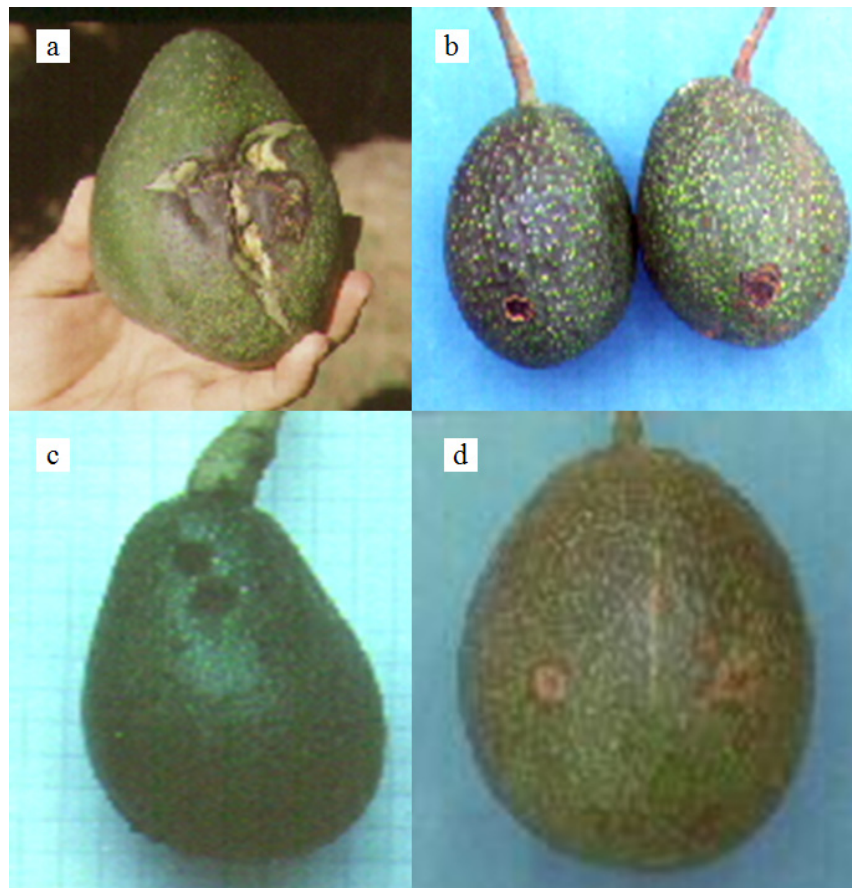


Figura 1. Síntomas ocasionados por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de aguacate encontrados en Michoacán, México durante 1994/95. a) Viruela, b) Manchas superficiales café brillante, c) Cuarteaduras en la lesión y d) antracnosis.

glutámico oxaloacética (GOT). Para el D: shikimato deshidrogenasa (SAD), fosfoglucomutasa (PGM), fosfohexosa isomerasa (PHI), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD), malato deshidrogenasa (MDH), malato deshidrogenasa (MDH), enzima malica (ME), fosfatasa ácida (ACPH).

El gel se extrajo de la cámara fría, se secó y se depositó en una tabla de acrílico; con un arco se cortaron cinco rebanadas longitudinales de 3 mm y cada una se colocó en una cuba de revelado donde posteriormente se le agregó la solución de sustrato específica para cada sistema enzimático. Las rebanadas con los sustratos se incubaron a 36 °C durante 24 a 48 h; se enjuagaron con agua corriente y se pasaron al fijador de ácido acético, metanol y agua 1:5:5, durante 24 horas. Posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se pasaron a una solución de glicerol a 10% durante 24 horas. Para conservar las muestras se cortaron dos cuadros de papel celofán, se empaparon con glicerol a 10% y uno de éstos se colocó sobre un cristal de mayor tamaño que la rebanada de gel, sobre éste se colocaron las rebanadas que se encontraban en glicerol, y se cubrieron con la otra parte de celofán cuidando de no dejar burbujas de aire y doblar los bordes sobrantes del celofán bajo el cristal. Estos se guardaron en oscuridad hasta que el gel se deshidrató y adquirió una consistencia flexible y casi transparente, destacando las bandas formadas por las isoenzimas.

La etapa fenológica de frutos de aguacate más susceptible al ataque de *Colletotrichum gloeosporioides*, se determinó inoculando once frutos por cada uno de diez diferentes tamaños seleccionados (Cuadro 1). La inoculación se realizó con 10 cultivos monoconidiales tomados al azar. Los frutos inoculados se colocaron en cámara húmeda para promover el desarrollo del hongo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis versicolor* (Speg.) Steyart y *Phomopsis perseae* Zerova. se aislaron de frutos colectados de los diferentes municipios (Cuadro 2). Mediante los postulados de Koch se logró la reproducción de los síntomas con los dos primeros. *Pestalotiopsis versicolor* se aisló de manchas similares a las de antracnosis, con la diferencia de que esta última formó estromas inconspicuos. Lo anterior es de gran importancia, ya que comúnmente se confunden los síntomas de *Pestalotiopsis versicolor* con *C.*

Cuadro 1. Diferentes tamaños de frutos de aguacate cv. Hass inoculados con cultivos monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados en diversos Municipios de Michoacán, México.

Tamaño del fruto	Longitud x Ancho (cm ²)
I	10,89 x 7,63
II	9,72 x 7,36
II	8,96 x 6,93
IV	7,95 x 6,24
V	6,85 x 5,41
VI	5,81 x 4,47
VII	4,75 x 3,7
VIII	3,9 x 3,2
IX	2,9 x 2,4
X	1,95 x 1,4
XI	1,4 x 1,1

Cuadro 2. Hongos aislados de frutos de aguacate con diversos síntomas de antracnosis y colectados en diferentes localidades del estado de Michoacán, México durante 1994/95.

Localidad	Síntomas	Hongo aislado	Número monoconidiales	Frecuencia (%)
Uruapan	Antracnosis y estroma superficial	Cg Pv Pp	7	16,66
Jucutacato	Viruela	Cg		
Toreo el Alto	Viruela	Cg	5	11,90
CEFBC	Manchas brillantes y estroma superficial	Cg Pv Pp	6	14,28
San Juan Nuevo Milpillan	Cuartheaduras	Cg Cg	8	19,04
Tancitaro	Viruela	Cg		
Agua Fría	Manchas brillantes	Cg Pp	6	14,28
Peribán	Viruela	Cg	5	11,90
Tacámbaro	Viruela	Cg	5	11,90

Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*;
Pv = *Pestalotiopsis versicolor*;
Pp = *Phomopsis perseae*

gloeosporioides, por lo que la fruta es rechazada para exportación ocasionando grandes pérdidas a los productores, siendo que el ataque de *Pestalotiopsis versicolor* se presenta sólo en la cáscara y no daña la pulpa. Los síntomas y sus estromas se enmascaran al oscurecerse el fruto cuando alcanza la madurez de consumo, pasando inadvertidos por el comprador. Este es el primer reporte de *Pestalotiopsis versicolor* atacando frutos de aguacate; ya que sólo se encontró una referencia que indica que este hongo se presenta en forma ocasional causando daños ligeros en hojas terminales, limitando su ataque únicamente en árboles criollos de aguacate (Martínez, 1977).

Se obtuvieron 42 cultivos monoconidiales de *C. gloeosporioides*, cinco monoconidiales (1-5) correspondieron a los aislamientos obtenidos de la localidad Toreo el Alto, ocho (6-13) de San Juan Nuevo, siete (14-20) del municipio de Uruapan, seis (21-26) de Tancítaro, cinco (27-31) de Tacámbaro, cinco (32-36) de Peribán y seis (37-42) del Campo Experimental Forestal “Barranca del Cupatitzio”.

Al inocular el hongo en 11 tamaños de fruto, se observó que los primeros diez no desarrollaron ningún síntoma; sin embargo, se logró determinar que los frutos fueron susceptibles al desarrollo del hongo hasta la etapa fenológica de madurez fisiológica sin importar el tamaño del fruto, tres a cuatro días después de cosechado. Lo anterior ha sido explicado porque la cáscara de frutos inmaduros de aguacate contiene un compuesto antifungal preformado identificado como 1-acetoxy-2-hidroxy-4-oxo-heneicosá-12,15-dieno, el cual inhibe el desarrollo del hongo mientras su concentración sea de 1200 µg/g, misma que se mantiene mientras el fruto está inmaduro, y decrece durante la maduración (Prusky *et al.*, 1982 y 1985).

Criterios utilizados para diferenciar variantes

Para cada criterio se efectuaron tres repeticiones; para el tamaño de conidios, se midieron 100, tomados al azar por cada monoconidial y para la forma de los mismos se consideró la predominante en 100 conidios. Se consideraron tres repeticiones, ya que trabajos similares reportaron consistencia con dos o tres repeticiones y midiendo 25, 30, 50 y 100 conidios (Denoyes y Baudry, 1995; Pamela y Douglas, 1992; Smith y Black, 1990).

Cultural

a) Forma y color de la colonia. Se identificaron once variantes con base al aspecto y color del micelio y la formación de anillos concéntricos (Cuadro 3); esta variabilidad fue mayor que la encontrada por Agostini *et al.* (1992) y Denoyes y Baudry (1995). El color de la colonia se ha utilizado para separar las especies de *Colletotrichum fragariae*, *C. acutatum* y a *C. gloeosporioides* en fresa apoyándose con otros criterios como forma de conidios y el color del medio de cultivo (Agostini *et al.*, 1992).

b) Crecimiento de la colonia en PDA. Se determinaron 19 variantes (v); indicativo de alta variabilidad de *C. gloeosporioides* o que este criterio es de poco peso para separación de variantes (Cuadro 3). Sin embargo, este método sigue utilizándose en la separación de especies de *Colletotrichum*; Denoyes y Baudry (1995) separaron 16 aislamientos aislados de fresa, 14 se identificaron como *C. acutatum*, dado su lento crecimiento, y 2 como *C. gloeosporioides* por su rápido crecimiento.

Morfológico

a) Tamaño de conidios. Se agruparon 23 variantes (Cuadro 3). Este criterio se empleó como una herramienta de peso en la separación de especies de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. acutatum* (Denoyes y Baudry, 1995). Variantes de *C. gloeosporioides* en mango han sido caracterizadas por

Cuadro 3. Separación por nueve criterios de variantes de *Colletotrichum gloeosporioides*, aislados en Michoacán, México durante 1994/95

Criterio	Variantes
1. Tamaño de conidios	23
2. Forma de conidios	4
3. Crecimiento de la colonia	19
4. Forma y color de la colonia	11
5. Diámetro de la lesión	9
6. Firmeza de la lesión	6
7. Peso de la pulpa invadida	3
8. Susceptibilidad a:	
Maneb	23
Oxicloruro de cobre	17
Benomil	7
Thiabendazol	5
9. Isoenzimas	14
Isoenzimas sobresalientes	3

el tamaño de sus conidios, sin embargo, no se especificó el número de éstos (Alahakoon *et al.*, 1992).

b) Forma de conidios. Por la forma de conidios se diferenciaron cuatro variantes (Cuadro 3 y Figura 2). Saccardo (1991) definió los conidios de *C. gloeosporioides* como típicamente rectos y cilíndricos, redondeados en su parte terminal. Esto contrasta con lo encontrado en el presente trabajo, donde se observaron conidios cilíndricos, y otros de forma oval y elipsoide-fusiforime, lo que concuerda con Pamela y Douglas (1992).

Además se localizaron conidios con forma cacahuatoide, y seis cultivos monoconidiales con conidios elipsoides-fusiforimes, similares a los reportados por Maas (1978), como *Gloeosporium* sp.; estos seis aislamientos no produjeron setas durante los 30 días que se revisaron; a diferencia del resto, que a los 15 días ya las presentaban. Los cultivos

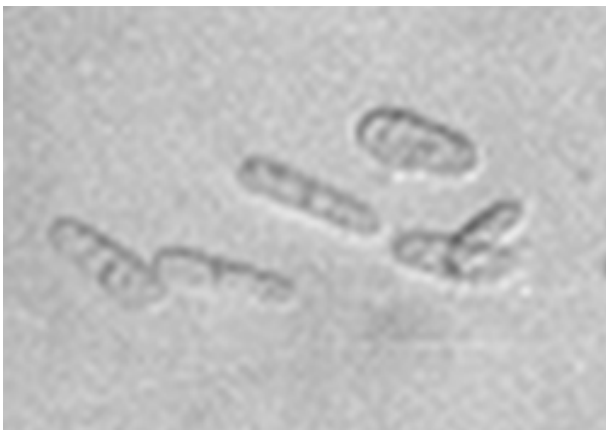
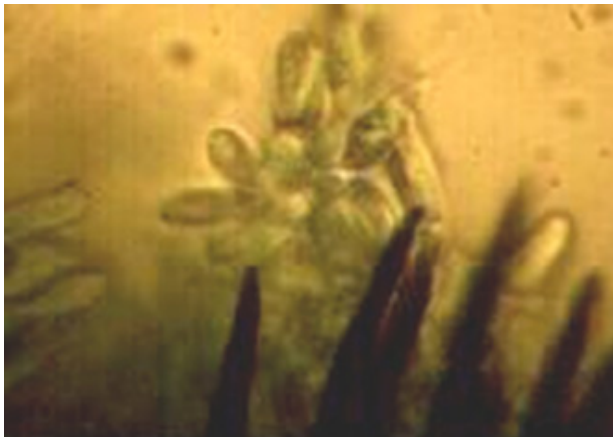


Figura 2. Forma de conidios producidos por cultivos monospóricos de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de frutos de aguacate en Michoacán, México durante 1994/95.

monoconidiales, en el presente estudio, fueron obtenidos por aislamientos de *C. gloeosporioides* que formaron setas; seis de estos subcultivos no las produjeron, por lo que *Gloeosporium* podría ser una variante de *Colletotrichum*, ya que la única diferencia entre los dos géneros es la ausencia o presencia de setas. El género *Gloeosporium* pareciera ser una variante de *C. gloeosporioides* sin la capacidad de formar setas.

Patogénico

a) Diámetro de la lesión. El diámetro de la lesión desarrollada en frutos de aguacate inoculados se usó para medir la patogenicidad de los cultivos monoconidiales. Este criterio es aceptable para diferenciar especies de *Colletotrichum*, según Maas (1983) y Smith y Black (1990). Asimismo fue utilizado por Miles y Lenné en 1984 y Lenné y Burdon en 1990, para separar variantes de *C. gloeosporioides* aislados de *Stylosanthes guianensis* (planta forrajera), encontrando amplia variabilidad. En el presente trabajo se agruparon nueve variantes patogénicas.

b) Firmeza de la lesión. La firmeza de lesión no se ha empleado para diferenciar especies ni variantes, pero en el presente estudio se usó como un criterio complementario. Se determinaron seis variantes y se realizó un análisis de correlación canónica entre las variables morfológicas (crecimiento de micelio y tamaño de conidios) y las patogénicas (tamaño y firmeza de la lesión). No se encontró relación entre éstas, sin embargo, sí la hubo en el análisis de correlación simple entre el tamaño de conidio y el de la lesión que mostró una correlación positiva, desde 0.6143 para el monoconidial 34 hasta el 0.9666 para el monoconidial 11.

c) Peso de la pulpa invadida. Diecinueve días después de la inoculación se definieron tres variantes. Aun cuando este criterio no se había usado anteriormente, la separación de las tres variantes coincide con el número de aquéllas agrupadas por el criterio de isoenzimas. Esta coincidencia debe probarse con más repeticiones, ya que si los dos criterios pudieran usarse con la misma efectividad sería de gran utilidad práctica.

d) Susceptibilidad a fungicidas *in vitro*. Se determinaron 17 variantes para el oxiclورو de cobre, 23 para el maneb, siete para el benomil, y cinco para el thiabendazol. La mayor variabilidad ocurrió con los

productos de contacto, (oxicloruro de cobre y maneb). La variación se debe probablemente al desarrollo de resistencia del hongo a estos productos. Sin embargo, esta aseveración requiere de confirmarse en campo, ya que la variación genética, por la susceptibilidad a fungicidas, no explica en 100% la variación, pues es más común que desarrolle resistencia a productos sistémicos y no a los de contacto como sucedió en este caso, quizás esto se deba a la alta frecuencia de las aplicaciones de estos productos y al largo tiempo que tienen de usarse en la zona aguacatera de donde se aislaron los monoconidiales estudiados. Por tanto este criterio sólo se empleó como un complemento a los anteriores.

Isoenzimático

a) Caracterización por isoenzimas. Mediante este criterio se diferenciaron 14 variantes, utilizando diferentes combinaciones de alelos de ocho sistemas isoenzimáticos. Desde el punto de vista morfológico, existen 23 variantes, y de acuerdo con los ocho sistemas isoenzimáticos se tienen 14 variantes genotípicas; nueve de las variantes se ligan a los monoconidiales de manera individual y cuatro dadas por la combinación de los ocho sistemas agrupan desde tres hasta 15 individuos. Este estudio preliminar indica que es posible encontrar algunos loci en otros sistemas isoenzimáticos que discriminen a esos tres grupos.

Se registraron un total de 8 loci con 14 alelos. A los loci y alelos que mostraron mayor migración en el zimograma se les dio el número uno, a los siguientes el número 2 y así sucesivamente hasta llegar a los más cercanos al origen. Se consideraron como genotipos sobresalientes aquellos que presentaron alelos diferentes a los de la mayoría de las muestras, es decir, en porcentaje igual o menor a 0.05%. La esterasa mostró un alto nivel de polimorfismo, dando por resultado nueve genotipos diferentes.

De los 14 sistemas enzimáticos utilizados para la identificación de variantes del hongo sólo seis resultaron apropiados para la caracterización isoenzimática, ya que mostraron un patrón de bandeo con suficiente resolución y actividad adecuada para usarse como patrones: Transaminasa glutámico oxaloacético (GOT), Fosfoexosa isomerasa (PHI), β -Glucosidasa (β -GLU), Fosfoglucomutasa (PGM), Esterasa (EST) y Catalasa (CAT).

El uso de isoenzimas para la determinación de variantes en hongos fitopatógenos es una herramienta que podría auxiliar a otros criterios utilizados hasta la fecha en la diferenciación de géneros, especies, formas especiales y variantes. Es importante tomar en cuenta que los estudios de marcadores genéticos han revelado cierta información sobre la estructura genética de poblaciones de patógenos en la década pasada, sin embargo, el número de patosistemas estudiados son muy pocos y la mayoría de los resultados que se han obtenido, al igual que en el presente estudio, deben considerarse como preliminares, ya que son adaptaciones de metodologías desarrolladas para estudiar la variación genética de plantas.

La variabilidad de *C. gloeosporioides* dependió del criterio utilizado (Cuadro 3), así por ejemplo en cuanto a conidios, fue más útil la forma del conidio que el tamaño para la determinación de especies (Pamela y Douglas, 1992). La prueba isoenzimática selecciona la variabilidad por criterios de presencia de enzimas, las cuales dependen de la composición genética de los individuos (Bonde, *et al.*, 1991).

El Municipio de Uruapan presentó el mayor número de variantes de *C. gloeosporioides* para casi la mayoría de los métodos utilizados, seguido por San Juan Nuevo (Cuadro 4). En estos dos municipios fue donde se establecieron las primeras huertas de aguacate y por consiguiente *C. gloeosporioides* ha estado durante más tiempo sometido a presiones diversas que pudieran provocar mutaciones y la formación de variantes genéticas. En este orden le siguen Tancítaro, Peribán y Tacámbaro, siendo este último el que menor variantes tiene, pero también es el más reciente en el cultivo de aguacate. Sin embargo, existen otros factores como la aplicación indiscriminada de plaguicidas, el manejo de huertos, suelo y el clima, para los que el hongo tiene mecanismos de supervivencia que le permiten cambiar o mutar bajo condiciones de frío y clima seco, ocasionando, por ejemplo, que las setas del hongo desarrollen la función de conidióforos y produzcan conidio como lo mencionan Smith y Black (1990). Esto pudiera influir en forma directa o indirecta en la aparición de variantes. Otros factores que influyen para el desarrollo de variación son las mutaciones y la recombinación sexual, (Miles *et al.*, 1984; Burdon y Roelfs, 1985), lo que es posible para *C. gloeosporioides* en aguacate, ya que la fase sexual

se forma en las hojas, ramas y frutos que se encuentran en el suelo (Escobar, 1985).

La variabilidad de *C. gloeosporioides* fue alta o baja dependiendo del criterio que se usó (Cuadro 4). Esto coincide con Liyanage *et al.*, (1992), quienes citan que las características de la variabilidad dependen del criterio utilizado; así por ejemplo en cuanto a conidios, es más útil la forma de los conidios que el tamaño para la determinación de especies (Pamela y Douglas, 1992). Una de las pruebas que se aceptan como de mayor peso es la isoenzimática; con este criterio se selecciona la variabilidad por criterios de presencia de enzimas las cuales dependen de la composición genética de los individuos, por lo que las enzimas pueden ser usadas como una forma importante para identificación de especies o variantes de *Colletotrichum* spp., lo que coincidió con lo reportado por Bonde *et al.*, (1991).

CONCLUSIONES

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz fue aislado de frutos de aguacate cv. Hass pero *Pestalotiopsis versicolor* (Speg.) Steyart también fue aislado de síntomas similares a los de antracnosis.

Frutos en la etapa fenológica de madurez fisiológica fueron los más susceptibles a la infección de *C. gloeosporioides*.

Se determinaron variantes de *C. gloeosporioides* a partir de 42 cultivos monoconidiales, con base en los criterios siguientes: 1. Cultural: a) por la forma y color de la colonia: 11 variantes; b) por la velocidad de crecimiento de la colonia: 19 variantes; 2. Morfológico: a) por el tamaño de conidios: 23 variantes; b) forma del conidio: 4 variantes; 3. Patogénico: a) diámetro de las lesiones: 9 variantes, b) firmeza de la lesión: 6 variantes, c) peso de la pulpa invadida: 3 variantes, d)

susceptibilidad a oxiclورو de cobre, maneb, thiabendazol y benomil: 17, 23, 5 y 7 variantes, respectivamente. 4. Isoenzimática: se diferenciaron 14 variantes de las cuales tres fueron sobresalientes, dos presentaron diferencia en 50% y una en 25% de los loci estudiados.

El municipio de Uruapan presentó mayor número de variantes de *C. gloeosporioides*, seguido por San Juan Nuevo.

LITERATURA CITADA

- Agostini, J. P.; L. W. Timmer and D. J. Mitchell. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. *Phytopathology* 82: 1377-1382.
- Alahakoon, P. W.; S. Sreenivasaprasad, A. E. Brown, and P. R. Mills. 1992. Selection of a genetic variants within *Colletotrichum gloeosporioides* isolates pathogenic on mango by passing through wounded tomato fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 227-240.
- Bonde, M. R.; G. L. Peterson and J. L. Maas. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology* 81: 1523-1528.
- Burdon, J. J.; and A. P. Roelfs. 1985 The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 75: 1068-1073.
- Denoyes, B. and A. Baudry. 1995. Species identification and pathogenicity study of French *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. *Phytopathology* 85: 53-57.

Cuadro 4. Agrupamiento de variantes de *Colletotrichum gloeosporioides* de acuerdo con ocho criterios de separación empleados y su distribución en Michoacán, México durante 1994/95.

Municipio	Forma de conidio	Isoenzimas	Diámetro de lesión	Pulpa invadida	Firmeza de lesión	Diámetro de colonia	Medición de conidios	Susceptibilidad †			
								O	M	B	T
Uruapan	3	8	3	2	3	14	16	15	14	4	4
S. Juan Nvo.	4	6	3	3	3	8	8	8	7	5	3
Táncitaro	3	2	4	2	2	4	6	5	5	2	2
Peribán	3	1	2	2	1	5	5	5	5	2	2
Tacámbaro	4	2	2	2	3	4	4	4	5	3	1

† O = Oxiclورو de cobre; M = Maneb; B = Benomil; T = Thiabendazol.

- Escobar, G. J. 1985. Identificación, distribución y control de marchitez de puntas del aguacatero (*Glomerella cingulata*)(Ston) Spauld-Schrenkz en la región de Uruapan, Mich. Tesis profesional UMSNH, Uruapan, Mich. 19 p.
- Fitzell, R. D. 1987. Epidemiology of anthracnose disease of avocados. S. Afr. Avocado Growers' Assoc. Yrb. 10: 113-116.
- Goodman, M. M. and C. W. Stuber., 1988. Maize. In S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.) Isoenzyme in plant genetics and breeding. Part B. 1-22. Elsevier, Amsterdam.
- Lenné, J. M. and J. J. Burdon. 1990. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. Phytopathology 80: 728-731.
- Liyanage, H. D.; R. T. McMillan and H. C. Kistler. 1992. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. Phytopathology. 82: 1371-1376.
- Maas, J. L. 1983. Pathogenicity and gel electrophoretic protein pattern comparisons among strawberry anthracnose fungi. (abstr.) Phytopathology 73:843.
- Maas, J. L. 1978. Anthracnose of strawberry fruit in Maryland. Plant Dis. Repr. 62: 488-492.
- Martínez, B. R. 1977. Relación de enfermedades del aguacatero en la región de Uruapan, Michoacán y áreas adyacentes. Boletín informativo PFIZER, División Agrícola. México. 37 p. Miles, J. W. and M. J. Lenné 1984. Genetic variation within a natural *Stylosanthes guianensis*, *Colletotrichum gloeosporioides* host-pathogen population. Aust. J. Agric. Res. 35: 211-18.
- Morales G., J. L. 1996. Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis en Michoacán. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Méx. 95 p.
- Mordue, J. E. M. 1971. CIM descriptions of pathogenic fungi. pp. 315,316,317.
- Pamela S. G. and W. G. Douglas. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Mycology 84: 157-165.
- Prusky, D.; N. T. Keen, J. J. Sims and S. L. Midland. 1982. Possible involvement of an antifungal compound in latency of *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruit. Phytopathology 72: 1578-1582.
- Prusky, D.; I. Kobiler, B. Jacoby, J. J. Sims and S. L. Midland. 1985. Inhibitors of avocado lipoxygenase: Their possible relationship with the latency of *Colletotrichum gloeosporioides*. Physiological Plant Pathology 27: 269-279.
- Saccardo, P. A.; M. R. Bonde, G. L. Peterson and J. L. Maas, 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Phytopathology 81: 1523-1528.
- Smith, B. J. and L. L. Black. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Dis. 74: 69-76.