

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
AREA INTEGRADA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA DE CEPAS DEL HONGO *colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., EN PLANTAS DE MANGO (*Manguifera indica* L.) Y PAPAYA (*carica papaya* L.), Y SERVICIOS REALIZADOS EN LA ESTACIÓN ICTA-CISUR, CUYUTA, ESCUINTLA.

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

ARIEL OSWALDO REYES DONIS

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO INGENIERO AGRÓNOMO EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA EN EL GRADO ACADEMICO DE LICENCIADO

Guatemala, Noviembre de 2008.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	MSc. FRANCISCO JAVIER VÁSQUEZ VÁSQUEZ
VOCAL I	ING. AGR. WALDEMAR NUFIO REYES
VOCAL II	ING. AGR. WALTER ARNOLDO REYES SANABRIA
VOCAL III	MSc. DANILO ERNESTO DARDÓN AVILA
VOCAL IV	Br. RIGOBERTO MORALES VENTURA
VOCAL V	Br. MIGUEL ARMANDO SALAZAR DONIS
SECRETARIO	MSc. EDWIN ENRIQUE CANO MORALES

Guatemala Noviembre de 2008

Guatemala, Noviembre de 2008

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de graduación: "Caracterización patológica, de cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., en plantas de Mango (*Manguifera indica* L..) y Papaya (*Carica papaya* L.) y servicios realizados en la estación, ICTA-CISUR, CUYUTA, ESCUINTLA", como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme.

Atentamente.

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Ariel Oswaldo Reyes Donis

Acto que dedico

A Dios, quien me dio fe, fortaleza, salud y esperanza para terminar mis estudios.

A mis padres, Marino Eleazar Reyes Rivadeneira y Lidia Eurdaned Donis Pivaral de Reyes, por haberme dado la vida, haberme educado y soportar mis errores, por sus consejos, amor, comprensión, paciencia y apoyo para culminar mi carrera profesional.

A mis hermanos, Mirna Lizzette, Gerardo Eleazar, Ángel David y Cecilia Ana Sofía, por compartir momentos significativos en nuestras vidas.

A mis sobrinos, Maria Alejandra, Jimena Sofía, Diego Eleazar y Ángel Gabriel, por ser bendiciones en mi vida.

A la familia Rodas Reyes, Armando, Angélica, Rocío Alejandra, en especial a María Ángeles, por sus muestras sinceras de apoyo, amistad y cariño durante toda mi carrera profesional.

A mis abuelos, tíos, tías, primos, primas y demás familia que tuvieron una palabra de apoyo para mí durante mis estudios.

Agradecimientos

Al Proyecto 025-2005, al Centro de Innovación Tecnológica del Sur (ICTA-CISUR-CUYUTA) y a la Facultad de Agronomía por el apoyo económico e institucional en la realización de este trabajo.

A mis asesores y evaluadores, Dr. David Monterroso Salvatierra, Ing. Agr. Gustavo Álvarez Valenzuela y al MSc. Amilcar Sánchez Pérez, por su ayuda y valiosas observaciones en todas las etapas del trabajo.

Gracias por todo papa y mama, por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, la verdad no encontré palabras para agradecerles todo lo que me han dado en la vida, solo sé que Dios, me ha dado la oportunidad de tener los mejores padres del mundo. Los quiero mucho.

A los ingenieros, Francisco Vásquez, Aníbal Salcbaja, Walter Reyes, Mario Alberto Méndez y al Licenciado Pedro Celestino Cabrera, con quienes tengo lazos de valiosa amistad desde inicios de la carrera.

Al profesor de inglés, Carlos Iboy por su valioso apoyo durante mis estudios profesionales.

Gracias sinceramente a todas las personas que de alguna manera han hecho posible este trabajo.

Resumen general

El ejercicio profesional supervisado, realizado en el periodo de febrero-noviembre de 2007, fue ejecutado en el Centro de Innovación Tecnológica del Sur (CISUR-Cuyuta) del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) ubicado en la aldea Cuyuta, Masagua, Escuintla; en el cual se trabajan programas de investigación. Esta institución contribuye al desarrollo de la ciencia y la tecnología agropecuaria, a la seguridad alimentaria nacional, a la protección de la salud humana y al mejor manejo de los recursos naturales, mediante la capacitación, generación y divulgación del conocimiento científico y tecnológico. Para el desarrollo del ejercicio profesional supervisado se seleccionó la línea de investigación de frutales tropicales.

Teniendo seleccionada la línea de seguimiento, se procedió a realizar el diagnóstico de la situación fitopatológica actual del programa de frutales tropicales del (ICTA-CISUR-Cuyuta), en el que se establecieron las plagas y enfermedades de mayor incidencia en los cultivos frutales presentes en esta área.

Según lo detectado en el diagnóstico, se estableció que la Antracnosis es la enfermedad de mayor incidencia en los diferentes cultivos frutales, principalmente en cultivos de mango y papaya., por lo que se dio continuidad a la línea de investigación en el área de frutales, realizando para ello el estudio titulado “Caracterización patológica, diagnóstico molecular, de seis cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., aisladas de plantas de Mango (*Mangifera indica* L.) y Papaya (*Carica papaya* L.), y evaluación de protección cruzada como alternativa de manejo poscosecha, en la Estación ICTA-CISUR, Cuyuta, Escuintla”

En dicha investigación se estableció, según las características patológicas, morfométricas y en el diagnóstico molecular que el agente causal de la antracnosis en mango y papaya es *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc; siendo importante enfatizar que

este se presenta de forma diferente según las condiciones ambientales y el hospedero en el que desarrolle.

Los resultados obtenidos de la caracterización morfométrica, nos muestran las diferencias cualitativas existentes entre cepas, como son las tonalidades en el color y forma micelial de las colonias, así como diferencias de las esporas en cuanto a tamaño y forma, de igual manera los resultados obtenidos en la caracterización patológica, nos dieron los fundamentos necesarios para la evaluación de pruebas como la protección cruzada, en la cual se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que se logró determinar que existe una protección tanto en frutos de mango como en papaya.

En adición, se realizó el diagnóstico molecular de las cepas aisladas en ambos cultivos, para determinar si las cepas obtenidas en ambos cultivos eran cepas netamente de *C. gloesporioides*. Para la determinación de la especie de estas cepas, se hizo la amplificación de la región ITS, utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los cebadores universales del gen ADNr 5.8S (ITS1: 5'TCCGT AGGTG AACCT GCGG3' e ITS4: 5'TCCTC CGCTT ATTGA TATGC3'), ya que esta permite la identificación de la especie.

Los servicios realizados se enfatizaron según las necesidades requeridas en la institución.

Se ejecutaron las siguientes actividades:

- Rotulación de los diferentes cultivos frutales ubicados dentro del programa de frutales del ICTA-CISUR-Cuyuta.
- Creación de un CD interactivo, el cual contiene fichas técnicas de los diferentes cultivos frutales dentro del programa de frutales del ICTA-CISUR-Cuyuta.
- Elaboración de un cepario el cual contiene cepas de *C.gloesporioides* , aisladas de mango, papaya, anona, aguacate, guayaba y carambola.

INDICE

Índice de figuras	iv
Índice de tablas.....	vi

CAPITULO I. DIAGNÓSTICO

Diagnóstico de plagas y enfermedades del programa de frutales del Centro de Innovación Tecnológica del Sur, del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA-CISUR Cuyuta, Masagua, Escuintla.

1.1	Presentación	1
1.2	Marco referencial.....	2
1.2.1	Ubicación geográfica	2
1.2.2	Vías de comunicación	2
1.2.3	Suelos y topografía	2
1.2.4	Clima y ecología.....	2
1.2.5	Aspectos Económicos	2
1.3	Objetivos.....	3
1.3.1	General	3
1.3.2	Específicos.....	3
1.4	Metodología	4
1.5	Resultados.....	6
1.5.a	Matriz de problemas.....	6
1.5.b	Plagas y enfermedades.....	7
1.6	Conclusión	22
1.7	Recomendaciones	23
1.8	Bibliografía	24

CAPITULO II. INVESTIGACIÓN

Caracterización patológica, diagnóstico molecular, de seis cepas del hongo *colletotrichum gloeosporioides* (penz.) penz. & sacc., aisladas de plantas de mango (*Mangúifera indica L.*) y papaya (*Carica papaya L.*), y evaluación de protección cruzada como alternativa de manejo postcosecha en la estación ICTA-CISUR, Cuyuta, Escuintla.

2.1	Presentación	27
2.2	Planteamiento del problema.....	28
2.3	Marco teórico	29
2.3.1	Marco conceptual	29
2.3.a	<i>Colletotrichum spp.</i>	29
2.3.b	Identificación y Reconocimiento de la Antracnosis	29
2.3.c	Clasificación Taxonómica	29
2.3.d	Descripción.....	30
2.3.e	Condiciones favorables	31
2.3.f	Ciclo Patológico de <i>Colletotrichum</i>	31
2.3.g	Biología y Ecología de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	33

2.3.h	Rango de hospederos	33
2.3.i	Distribución Geográfica de <i>Colletotricum gloeoporioides</i>	33
2.3.j	Penetración del hongo	34
2.3.k	Sintomatología	34
2.3.l	Manejo en Postcosecha	36
2.3.m	Protección cruzada	36
2.3.n	Purificación de hongo.....	37
2.3.ñ	Cultivos monospóricos	37
2.3.o	Marcadores moleculares	37
2.3.p	Secuenciación de ADN	38
2.3.q	Reacción en cadena de la polimerasa	38
2.3.r	Espaciadores de transcripción interna.....	38
2.4	Marco referencial	39
2.4.a	Ubicación geográfica.....	39
2.4.b	Vías de comunicación	39
2.4.c	Suelos y topografía	39
2.4.d	Clima y ecología.....	39
2.4.e	Aspectos Económicos	39
2.5	Objetivos.....	40
2.5.a	General.....	40
2.5.b	Específicos	40
2.6	Hipótesis.....	41
2.7	Metodología.....	42
2.7.a	Caracterización en campo.....	42
2.7.b	Caracterización de síntomas	42
2.7.c	Caracterización de signos	42
2.7.d	Toma y traslado de material enfermo	42
2.7.e	Caracterización en laboratorio.....	42
2.7.f	Caracterización de síntomas.....	42
2.7.g	Caracterización de signos	43
2.7.h	Aislamiento y purificación de colonias	43
2.7.i	Siembra en medio de cultivo	43
2.7.j	Purificación del hongo	43
2.7.k	Cultivos monospóricos	44
2.7.l	Diagnóstico molecular	44
2.7.m	Cultivo de micelio	44
2.7.n	Liofilización del micelio.....	45
2.7.ñ	Procedimiento para la Extracción de DNA.....	45
2.7.o	Electroforesis	47
2.7.p	Amplificación por PCR	48
2.7.q	Sistema de Purificación Directa de DNA.....	49
2.7.r	Secuenciación de las cepas de <i>Colletotrichum</i>	50
2.7.s	Pruebas de patogenicidad.....	50
2.7.t	Prueba de patogenicidad en mango.....	51
2.7.u	Prueba de patogenicidad en papaya	51
2.7.v	Pruebas de patogenicidad en hojas de papaya.....	51
2.7.w	Pruebas de infección cruzada	52
2.7.z	Evaluación de protección cruzada.....	53
2.7.a.a	Evaluación de protección cruzada en mango	53

2.7.a.b	Evaluación de protección cruzada en papaya.....	54
2.8	Recursos.....	55
2.9	Cronograma de ejecución del proyecto de investigación.....	56
2.10	Resultados.....	57
2.10.a	Caracterización en campo.....	57
2.10.b	Caracterización de síntomas.....	57
2.10.c	Cultivo de mango.....	57
2.10.d	Cultivo de papaya.....	57
2.10.e	Caracterización de signos.....	58
2.10.f	Toma y traslado de material enfermo.....	59
2.10.g	Caracterización en laboratorio.....	60
2.10.h	Caracterización de síntomas.....	60
2.10.h.a	Cultivo de mango.....	60
2.10.h.b	Cultivo de papaya.....	61
2.10.i	Caracterización de signos.....	61
2.10.i.a	Cultivo de Mango.....	61
2.10.i.b	Cultivo de papaya.....	63
2.10.j	Obtención de aislamientos de <i>Colletotrichum</i>	63
2.10.k	Siembra en medio de cultivo.....	63
2.10.l	Purificación del hongo.....	64
2.10.n	Caracterización morfométrica:.....	65
2.10.ñ	Cepas provenientes de Mango.....	65
2.10.o	Cepas provenientes de Papaya.....	69
2.10.p	Pruebas de patogenicidad.....	70
2.10.q	Pruebas de patogenicidad en mango.....	71
2.10.r	Pruebas de patogenicidad en frutos de mango:.....	71
2.10.s	Pruebas de patogenicidad en papaya.....	74
2.10.t	Pruebas de patogenicidad en frutos de papaya.....	74
2.10.u	Pruebas de patogenicidad en hojas de papaya.....	76
2.10.v	Pruebas de infección cruzada.....	79
2.10.w	Prueba de infección cruzada en mango.....	79
2.10.x	Prueba de infección cruzada en papaya.....	81
2.10.y	Evaluación de protección cruzada.....	83
2.10.z	Evaluación de protección cruzada en mango.....	83
2.10.a.a	Evaluación de protección cruzada en papaya.....	86
2.10.a.b	Diagnóstico molecular.....	88
2.11	Recomendaciones.....	94
2.12	Bibliografía.....	95
2.13	Anexos.....	99
Anexo 1	Cultivo de papaya(<i>Carica papaya</i> L.).....	99
Anexo 2	Cultivo de Mango (<i>Manguifera indica</i>).....	100
Anexo 3	Formulario para secuenciación de cepas de <i>Colletotrichum</i>	102
Anexo 4	Aislamiento de hongos patógenos del tejido una planta infectada.	104
Anexo 5	Preparación de medios de cultivo sólidos en cajas Petri y tubos de ensayo .	104
Anexo 6	Métodos de penetración e invasión por hongos.....	105
Anexo 7	Secuencias de <i>C. gloesporioides</i> obtenidas en el programa Chromas	105
Anexo 8	Glosario de terminos fitopatológicos.....	107

CAPITULO III. SERVICIOS

Servicios realizados en el centro de Innovación Tecnológica del Sur, del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA-CISUR, Cuyuta

Masagua, Escuintla

3.1 Presentación	109
3.2 Objetivos	110
3.3 Servicio 1 Rotulación de especies frutícolas	111
3.3.a Metodología	111
3.4 Resultados.....	112
3.5 Conclusiones	113
3.6 Servicio 2 Elaboración de cd interactivo	114
3.7.a Metodología	114
3.8 Servicio 3 Elaboración de Cepario.....	117
3.8.a Metodología	117
3.9 Resultados	118
3.10 Conclusiones.....	119
3.11 Recomendaciones.....	120
3.12 Anexos	121

Índice de figuras

1. Fruto de banano afectado por <i>Pyricularia grisea</i>	7
2. Fruto de banano afectado por <i>Cercospora hayi</i>	7
3. Fruto de banano afectado por <i>Colletotrichum musae</i>	8
4. Hoja de banano afectada por <i>Cordana musae</i>	8
5. Hojas de palmito afectadas por <i>Erwinia stewartii</i>	9
6. Hoja de palmito afectada por <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	9
7. Hoja de palmito afectada por <i>Cercospora palmivora</i>	10
8. Tallos de palmito afectados por <i>Phytophthora palmivora</i>	10
9. Hojas de palmito afectadas por <i>Cercospora sp.</i>	11
10. Frutos de naranja afectados por CiLV.	11
11. Fruto de naranja afectada por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>citri</i>	12
12. Hojas y fruto de limón afectados por <i>Gloesporium limeticola</i>	12
13. Hojas de limón afectadas por <i>Sphaceloma sp.</i>	13
14. Hojas de cítricos afectadas por <i>Fumago sp</i>	13
15. Hojas de lima afectadas por <i>Septobacidium pseudopedicellatum</i>	14
16. Hojas y fruto de maracuya afectadas por <i>Cladosporium herbarum</i>	14
17. Fruto de maracuyá afectado por <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	15
18. Raíces de maracuya afectadas por <i>Fusarium solani</i>	15
19. Frutos de papaya afectados por <i>Phytophthora palmivora</i>	16
20. Fruto de papaya afectado por <i>Colletotrichum gloesporioides</i>	16
21. Raíces de papaya afectadas por <i>Fusarium solani</i>	17

22. Hojas de papaya afectadas por <i>Asperisporium caricae</i>	17
23. Hojas de papaya afectadas por <i>Corynespora cassicola</i>	18
24. Pulgón negro <i>Pentalonia nigronervosa</i>	18
25. Picudo negro <i>Cosmopolites sordius</i>	19
26. Picudo del palmito <i>Rynchophorus palmarum</i>	19
27. Minador de cítricos <i>Phyllonistis citrella</i>	20
28. Acaro de la leprosis <i>Brevipalpus phoenicis</i>	20
29. Mosca de la fruta <i>Anastrepha distincta</i>	21
30. Beuveria Bassiana en picudo.....	21
31. Acérvulo de <i>Colletotrichum</i> , Barnet 1998.	30
32. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum</i> . Agrios 2005.	32
33. A. Fruto de papaya infectado por <i>Colletotrichum</i> B. flor de paya infectadas con <i>Colletotrichum</i>	35
34. Flor, hojas y fruto de mango con <i>Colletotrichum</i>	36
35. Síntomas ocasionados por <i>C. gloesporioides</i> : A--flores.B-hojas. C-frutos. D-pedunculos. De mango	57
36. Síntomas ocasionados por <i>C. gloesporioides</i>	58
37. Signos de <i>C. gloesporioides</i> en hojas de mango.....	58
38. Signos de <i>C. gloesporioides</i> en frutos de papaya.	59
39. Frutos de papaya colocados en cámara húmeda	59
40. Síntomas ocasionados por <i>C. gloesporioides</i> en frutos de mango.	60
41. Síntomas ocasionados por <i>C. gloesporioides</i> en fruto de papaya	61
42. Hoja de mango con presencia de acérvulos de <i>C. gloesporioides</i>	62
43. Hoja de mango con presencia de acérvulos en esporulación.....	62
44. Acérvulo de <i>Colletotrichum</i> , en hojas de mango	63
45. Signos ocasionados por <i>C. gloesporioides</i> en fruto de papaya	63
46. Realización de cultivos monospóricos.....	64
47. Conidias de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de fruto de mango, cepa 1	65
48. Colonia de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de fruto de mango, cepa 1	65
49. Colonia de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de flor de mango cepa 2	66
50. Conidias de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de flor de mango, cepa2	66
51. Colonia de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de pedúnculo de mango cepa 3	67
52. Conidias de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de pedúnculo de mango cepa 3	67
53. Colonia de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de hoja de mango cepa 4	68
54. Conidias de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de hoja de mango cepa 4.....	68
55. Colonia de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de fruto de papaya cepa 1	69
56. Conidias de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de fruto de papaya cepa1	69
57. Colonia de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de flor de papaya cepa 2	70
58. Conidias de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> aislado de flor de papaya cepa 2.....	70
59. Bandas, gel de agarosa con bandas amplificadas de cepas de mango y papaya. ...	88
60. Árbol Filogenético de las cepas de <i>Colletotrichum</i> sp.	90
61. Elaboración de rótulos.	112
62. Rotulación de árboles frutales.....	113
63. Presentación CD interactivo.....	115
64. Contenido CD interactivo, cultivo de papaya.....	116
65. Cepario de <i>Colletotrichum</i>	118
66. Mapa del área de frutales con coordenadas UTM.....	121

Índice de tablas

1. Dimensiones de conidias de <i>C. gloesporioides</i> aisladas de mango	65
2. Dimensiones de conidias de <i>C. gloesporioides</i> aisladas de mango	66
3. Dimensiones de conidias de <i>C. gloesporioides</i> aisladas de mango	67
4. Dimensiones de conidias de <i>C. gloesporioides</i> aisladas de mango	68
5. Dimensiones de conidias de <i>C. gloesporioides</i> aisladas de papaya	69
6. Dimensiones de conidias de <i>C. gloesporioides</i> aisladas de papaya	70



CAPITULO I

DIAGNÓSTICO

Diagnóstico de plagas y enfermedades del programa de frutales tropicales del Centro de Innovación Tecnológica del Sur, del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.

1.1 Presentación

El Centro de Innovación y Tecnología del Sur (CISUR-Cuyuta) del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) trabaja con diferentes programas, los cuales generan información utilizada en el desarrollo de nuevas técnicas en el manejo de los cultivos tanto en su modo de producción, dentro de los cuales se puede mencionar el control de plagas y enfermedades, así como también la comercialización de sus frutos. En las instalaciones del ICTA se realizan investigaciones de frutales tropicales dentro de los cual podemos mencionar los cultivos de Aguacate, Anona, Carambola, Guayaba, Mango, Mangostán, Marañón, Naranja, Papaya, Pejibaye, Palmito, Limón, Toronja, entre otros; la comercialización de estos frutos es de gran importancia para el ICTA-CISUR-Cuyuta, ya que de aquí se obtienen ingresos, los cuales sirven para absorber parte de los gastos que requiere el mantenimiento del programa de frutales.

Las enfermedades e insectos plaga de cultivos son uno de los factores más limitantes en la producción agrícola. La identificación precisa de la plaga es un paso básico e indispensable para el diseño de una estrategia de manejo integrado.

El presente diagnóstico, fue producido para mostrar los avances en el conocimiento de las plagas y enfermedades que afectan a los diferentes cultivos establecidos en el ICTA-CISUR-Cuyuta. Las plagas incluidas en el diagnóstico, fueron diagnosticadas y determinadas en los laboratorios de fitopatología y entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de san Carlos de Guatemala.

Este diagnóstico puede ser utilizado para el reconocimiento *a priori* de las principales plagas y enfermedades, y como una herramienta de capacitación para técnicos, promotores y agricultores. Cada fotografía describe una plaga o enfermedad. En la parte superior izquierda lleva el nombre común y científico (género y especie) de la plaga o agente causante de la enfermedad. En la parte superior derecha se encuentra el nombre del cultivo y, en el caso de enfermedades se indica el agente causal (AC).

1.2 Marco referencial

1.2.1 Ubicación geográfica

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla, se encuentra localizado en la vertiente sur de la República de Guatemala, en las coordenadas 14° 7', latitud Norte y 71° 09', longitud Oeste (18), inserta en el Parcelamiento Cuyuta, del Municipio de Masagua, Escuintla.

1.2.2 Vías de comunicación

El parcelamiento Cuyuta cuenta con una carretera principal que lo comunica con el municipio de Masagua, Puerto de San José y con la cabecera departamental de Escuintla (18).

1.2.3 Suelos y topografía

Los suelos del área son de origen aluvial, con drenaje moderado, color café, textura franco – arenosa, espesor del horizonte “A” de 40 a 50 cms., estructura granular con bajo contenido de materia orgánica. Predominan los suelos de clase agrológica I, II y III. El parcelamiento cuenta con relieves casi planos, con desniveles de 3 a 4% (18).

1.2.4 Clima y ecología

El clima está comprendido dentro de la zona tropical cálida. La precipitación pluvial promedio anual es de 2,120mm que varía en un rango que va de 1241.2mm a 3,995.2mm, con temperatura mínima de 21°C y máxima de 34°C, la altura sobre el nivel del mar es de 48m. El parcelamiento se encuentra dentro de la zona de vida Bosque Húmedo Subtropical (Cálido) (18).

1.2.5 Aspectos Económicos

Puede apreciarse que la explotación de las parcelas es de tres formas: explotación agrícola, ganadera y mixta (18). Dentro de la explotación agrícola el principal cultivo son los árboles frutales.

1.3 Objetivos

1.3.1 General

Establecer un diagnóstico de plagas y enfermedades en el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA, en el Proyecto de Frutales en el parcelamiento Cuyuta, Masagua, Escuintla.

1.3.2 Específicos

- Identificar los problemas de plagas y enfermedades primarias y secundarias que presenta la producción de frutales del ICTA-CISUR- CUYUTA.
- Generar nueva información para la elaboración de proyectos de servicios y de investigación que promuevan posibles soluciones a los problemas de plagas y enfermedades.

1.4 Metodología

Para la realización del diagnóstico sobre plagas y enfermedades presentes en el proyecto de frutales, se utilizó información obtenida mediante entrevistas a personas a fines a las actividades del centro de investigación, así mismo se realizaron observaciones directas con las cuales se pudo determinar la situación actual del proyecto de frutales respecto a las plagas y enfermedades presentes dentro del mismo.

1.4.1 Obtención de Información

1.4.a Observación

Se realizaron recorridos dentro del área de frutales del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA (CISUR-Cuyuta), con lo cual se pudo determinar la situación actual de los frutales respecto a las plagas y enfermedades dentro de la misma, se tomaron notas de campo así como fotografías que fueron de utilidad para conocer la sintomatología de los diversos árboles frutales. Así mismo se realizó un croquis del área siendo de esta manera más fácil ubicar los cultivos.

1.4.b Trabajo de Laboratorio

Se tomaron muestras de los diferentes árboles frutales, del proyecto de frutales del ICTA (CISUR-Cuyuta) estas muestras vegetales presentaron síntomas de enfermedad (manchas, clorosis o amarillamiento etc.), también se recolectaron insectos que se sospechó eran los causantes de los daños, así como posibles vectores de enfermedades.

1.4.c Revisión de Literatura

Se hizo una recopilación de información sobre los diferentes frutales con lo cual pudimos reforzar la información primaria obtenida por medio de observación directa, muestreos acerca de plagas y enfermedades.

1.4.d Sistematización de la información

Luego de haber recolectado toda la información necesaria se procedió a ordenarla y clasificarla para su fácil entendimiento, esta información sirvió para elaborar el diagnóstico.

1.4.e Matriz de problemas

Se realizó una matriz de problemas, con la cual se determinó la situación actual del programa de frutales.

1.5 Resultados

1.5.a Matriz de problemas

Mediante esta matriz se pudo determinar que el mayor problema dentro del área de frutales, es la poca información que se tiene sobre las plagas y enfermedades que afectan los diferentes cultivos establecidos en el área del programa de frutales, seguido de la falta de recursos para mantenimiento de los mismos, así mismo la falta de control de plagas y enfermedades es muy limitada. Esta matriz se elaboró con ayuda del ingeniero a cargo del área de frutales Ing. Agr. Ottoniel Sierra. En la cual se les asignó una numeración a los problemas encontrados en el proyecto de frutales. Los problemas están colocados de forma vertical y horizontal en la matriz. Vemos que el mayor problema es la falta de información técnica sobre los cultivos, ya que este problema se repite con mayor frecuencia en la matriz, influyendo en el control de plagas, control de enfermedades. Seguido de este problema se encuentra la faltan de recursos influyendo en el control de plagas, control de enfermeddes.

MATRIZ DE PROBLEMÁTICA						
	1	2	3	4	5	6
6	6	6	3	6	5	
5	5	5	3	4		
4	4	4	3			
3	3	3				
2	2					
1						

Referencia		frec
1	Control de plagas	0
2	Control de enfermedades	1
3	Falta de info. Técnica	5
4	Falta de recursos	3
5	Parcelas demostrativas representativas	3
6	Falta de divulgación	3

1.5.b Plagas y enfermedades

Mancha Johnston *Pyricularia grisea*

BANANO
AC:Hongo



Figura 1. Fruto de banano afectado por *Pyricularia grisea*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Aparece en los frutos cerca de la madurez y se incrementa cuando éstos son transportados al mercado. En un inicio aparece como puntos rojizos sobre la cáscara que luego se vuelven manchas circulares, necróticas, hundidas, rodeadas de un halo rojizo y más exteriormente, de un halo grasoso de color verde.

Mancha diamante *Cercospora hayi*

BANANO
AC:Hongo



Figura 2. Fruto de banano afectado por *Cercospora hayi*.

Fuente: Fotografía tomada en campo, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Ocurre en los pedúnculos, corona y frutos. Se presenta en un inicio como manchas circulares café oscuro con centro hundido y agrietado, rodeada de un halo amarillo. Estas toman forma de rombo. Algunas veces el tejido manchas crecen, se vuelven negras y la parte central se agrieta exponiendo la pulpa del fruto.

Antracnosis*Colletotrichum musae*

BANANO

AC:Hongo



Figura 3. Fruto de banano afectado por *Colletotrichum musae*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En frutos aparecen primero puntos necróticos que desarrollan en manchas negras ovaladas, hundidas y con presencia de puntos anaranjados en el centro que son las fructificaciones del hongo.

Se manifiesta cerca a la madurez, porque el hongo necesita azúcares para desarrollarse.

Mancha cordana*Cordana musae*

BANANO

AC:Hongo



Figura 4. Hoja de banano afectada por *Cordana musae*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Las hojas presentan manchas ovaladas con centro grisáceo y borde rojizo necrótico. Muchas veces estas manchas están rodeadas de un halo amarillo. Se presenta particularmente en los bordes de la hoja y a veces puede necrosar toda la hoja.

Bacteriosis foliar
Erwinia stewartii

PALMITO
AC:Bacteria



Figura 5. Hojas de palmito afectadas por *Erwinia stewartii*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007
En las hojas aparecen manchas húmedas, entre las nervaduras, que van alargándose y creciendo. En el envés se forman sustancias azucaradas en granos pegajosos de color amarillo que son una exudación de la planta como respuesta a la infección bacteriana. Estas manchas pueden cubrir toda la hoja. Esta enfermedad puede llegar a matar toda la planta. Cuando la enfermedad llega a la base del tallo, éste se pudre y puede provocar caída de plantas. Los hijuelos pueden contagiarse al rozar sus hojas con la planta madre y no porque la bacteria se mueva a través de haces vasculares.

Antracnosis
Colletotrichum gloesporioides

PALMITO
AC:Hongo

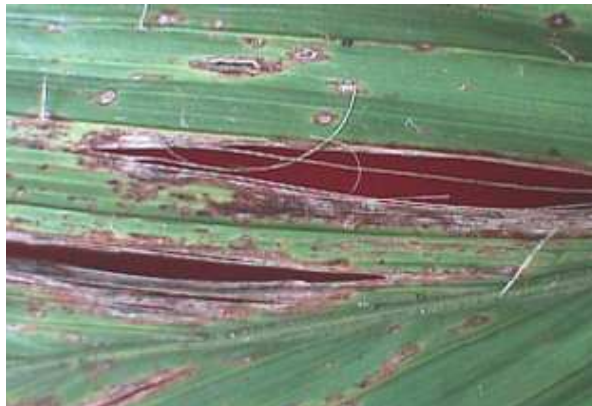


Figura 6. Hoja de palmito afectada por *Colletotrichum gloesporioides*

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Sobre las nervaduras de las hojas aparecen puntos necróticos de color café oscuro, rodeados de halo amarillo. Conforme crecen, el centro se vuelve claro y el borde se torna café oscuro. A medida que la mancha madura el tejido parenquimático afectado se va cayendo y sólo quedan las nervaduras. El hongo puede alcanzar grandes áreas de tejido si muchas manchas se unen, afectando la fotosíntesis.

Mancha foliar
Cercospora palmivora

PALMITO
AC.Hongo



Figura 7. Hoja de palmito afectada por *Cercospora palmivora*.
Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En hojas aparecen puntos negros pequeños rodeados de halo amarillo que conforme crecen cambian a un color gris claro con el centro oscuro.

Mal de almacigo
Phytophthora palmivora

PALMITO
AC:Hongo



Figura 8. Tallos de palmito afectados por *Phytophthora palmivora*.
Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

A nivel de cuello se presentan estrías necróticas.
La hoja bandera de las plántulas afectadas se desprende fácilmente por pudrición de la base.

Mancha foliar
Cercospora sp

PALMITO
AC:Hongo



Figura 9. Hojas de palmito afectadas por *Cercospora sp.*
Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En hojas se presentan manchas irregulares con centro claro rodeadas de halo necrótico café, algunas con punto central oscuro.

Leprosis de los cítricos
Virus de la leprosis de los cítricos CiLV

NARANJA
AC: Virus



Figura 10. Frutos de naranja afectados por CiLV.
Fuente: Fotografía tomada en campo, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Se observan manchas necróticas rodeadas de un halo amarillo muy notorio.

Cancrosis de los cítricos

Xanthomonas axonopodis pv *citri*

NARANJA
AC:Bacteria



Figura 11. Fruto de naranja afectada por *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

La enfermedad se manifiesta en todos los órganos de la planta. El tamaño de las lesiones que causa depende de la susceptibilidad del hospedero.

En hojas aparecen lesiones, levantadas en ambas caras, que presentan un borde de color café y un centro de color gris. Las lesiones presentan una zona corchosa alrededor.

En los tallos se presentan canchros levantados que causan deformación de la corteza y pueden matar brotes tiernos. En frutos aparecen manchas cloróticas que al tacto se perciben levantadas. Posteriormente las manchas se vuelven de color café claro u oscuro, se llenan de corcho y se resquebrajan en el centro. En variedades susceptibles estas manchas están rodeadas de un halo amarillo.

Antracnosis

Gloesporium limeticola

LIMON
AC:Hongo



Figura 12. Hojas y fruto de limón afectados por *Gloesporium limeticola*

Fuente: Fotografía tomada en campo, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En hojas se presentan manchas necróticas pequeñas e irregulares, que conforme crecen se desprenden dejando el centro hueco. En ramas y nervaduras se presentan lesiones ovaladas y hundidas. Los frutos presentan lesiones levantadas de color café claro que se diferencian del cancro porque no tienen halo amarillo.

Verugosis
Sphaceloma sp

LIMON
AC:Hongo



Figura 13. Hojas de limón afectadas por *Sphaceloma sp*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Las hojas, en ambas caras, presentan pequeñas lesiones sobresalientes, corchosas e irregulares de color café claro, siendo más abundantes en el envés. En las hojas más jóvenes hay deformación del limbo cuando las lesiones afectan las nervaduras. En tallos tiernos se observa el mismo tipo de lesiones descritas para las hojas.

Fumagina
Fumago sp

CITRICOS
AC:Hongo



Figura 14. Hojas de cítricos afectadas por *Fumago sp*

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En hojas, frutos y ramas aparece una especie de micelio negro que crece sobre sustancias azucaradas producidas por cochinillas harinosas, moscas blancas o pulgones. El hongo no penetra al tejido, pero al crecer sobre la hoja reduce la capacidad fotosintética de la planta.

Fieltro o cuero*Septobacidium pseudopedicellatum*LIMA
AC:Hongo

Figura 15. Hojas de lima afectadas por *Septobacidium pseudopedicellatum*

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En hojas, ramas y frutos aparece un micelio blanco con centro de color café. Posteriormente el micelio se vuelve de color café claro y crece cubriendo los órganos como si fuera una especie de cuero o piel, dando origen a su nombre común.

Verrugosis*Cladosporium herbarum*

MARACUYA

AC:Hongo



Figura 16. Hojas y fruto de maracuya afectadas por *Cladosporium herbarum*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En el haz de las hojas se observan manchas necróticas con centro claro y borde de color café. En el envés se observan las fructificaciones del hongo causante como una pelusilla verde grisácea. En ramas, brotes tiernos y zarcillos se presentan manchas necróticas, en un inicio redondeadas y que toman, posteriormente, forma alargada. Los frutos presentan pequeñas manchas hundidas de color café claro que luego se hipertrofian formando una veruga.

Antracnosis*Colletotrichum gloesporioides*

MARACUYA

AC:Hongo



Figura 17. Fruto de maracuyá afectado por *Colletotrichum gloesporioides*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Las hojas muestran manchas necróticas concéntricas que presentan la fructificación del hongo al centro, a manera de puntos negros. El tejido afectado a veces se resquebraja. En los frutos se presentan manchas de color café claro que crecen alcanzando grandes superficies. Las lesiones se hunden, el centro de las mismas se torna de color oscuro y muestra las fructificaciones del hongo.

Pudrición radicular*Fusarium solani*

MARACUYA

AC:Hongo



Figura 18. Raíces de maracuya afectadas por *Fusarium solani*.

Fuente: Fotografía tomada en campo, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

El cuello de la raíz presenta una necrosis que resquebraja los tejidos de esa zona, los cuales se cubren de un micelio blanco que luego toma coloración rojiza. Las raíces se tornan totalmente necróticas. Las hojas se tornan amarillas y preneocróticas. La enfermedad puede matar la planta.

Pudrición blanda del fruto

Pithophthora palmivora

PAPAYA
AC:Hongo



Figura 19. Frutos de papaya afectados por *Pithophthora palmivora*.

Fuente: Fotografía tomada en campo, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En los frutos aparecen lesiones acuosas que se cubren con un micelio blanco algodonoso debajo del cual ocurre una pudrición blanda. Lesiones similares se presentan en el pecíolo y tallos jóvenes causando caída prematura de frutos y hojas. En tallos más maduros las lesiones se alargan y los debilitan causando caída de plantas cuando hay vientos fuertes.

Antracnosis

Colletotrichum gloesporioides

PAPAYA
AC:Hongo



Figura 20. Fruto de papaya afectado por *Colletotrichum gloesporioides*

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En los frutos los síntomas se observan inicialmente como pequeños puntos rojizos que se tornan en manchas ligeramente hundidas, de varios centímetros de diámetro, con centro oscuro. Cuando las lesiones se unen se destruyen extensas áreas; esto ocurre principalmente en frutos maduros.

Pudrición radicular
Fusarium solani

PAPAYA
AC:Hongo



Figura 21. Raíces de papaya afectadas por *Fusarium solani*

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

La infección se inicia en las puntas de las raíces secundarias, las cuales se pudren. La pudrición continúa en las raíces primarias, hasta que todo el sistema radicular es completamente afectado. Las plantas se tornan cloróticas y se caen.

Viruela
Asperisporium caricae

PAPAYA
AC:Hongo



Figura 22. Hojas de papaya afectadas por *Asperisporium caricae*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En el haz de las hojas se presentan manchas necróticas circulares, a veces rodeadas por un halo clorótico. En el envés, estas manchas se pueden observar como una masa pulverulenta de color negro, que es la fructificación o signo del hongo causante. Los frutos presentan lesiones acuosas con un punto blanco en el centro. A medida que éstas progresan se forman pústulas salientes de color beige a marrón y conforme el fruto madura, se vuelven oscuras por la fructificación del hongo. Las lesiones del fruto no comprometen la pulpa, pero sí afectan su calidad.

Mancha blanca*Corynespora cassicola*

PAPAYA

AC:Hongo

Figura 23. Hojas de papaya afectadas por *Corynespora cassicola*

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

En todo el limbo de la hoja se producen manchas circulares pequeñas de color blanco, de aspecto seco, ligeramente hundidas y rodeadas de anillo necrótico de color café claro. En lesiones maduras, en el envés, se puede apreciar un micelio de color gris verdoso muy compacto y algodonoso.

Pulgón negro*Pentalonia nigronervosa*

BANANO

FASE: ninfa, adulto

Figura 24. Pulgón negro *Pentalonia nigronervosa*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Estos insectos viven formando colonias y succionan la savia de las plantas. Se los localiza en el pseudotallo, hojas nuevas y frutos. Este insecto es vector del virus "Banana Bunchy Top Disease (BBTD)".

Picudo negro*Cosmopolites sordidus*PLATANO
FASE: adultoFigura 25. Picudo negro *Cosmopolites sordidus*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

La larva ataca los cormos o rizomas abriendo galerías. En las plantas atacadas las hojas centrales se comienzan a secar y posteriormente ocasionan la muerte de la planta. Plantas fuertemente infestadas pueden caerse.

Picudo del palmito*Rynchophorus palmarum*PALMITO
FASE: adultoFigura 26. Picudo del palmito *Rynchophorus palmarum*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Daño. El adulto oviposita en la base del tallo y las larvas forman galerías en el mismo. Es fácil detectar la presencia de las larvas ya que de las galerías que ellas abren en los tallos exuda una sustancia mucilaginosa. Se ha comprobado que el ataque de las larvas no ocasiona pérdidas en rendimientos de palmito.

Minador de cítricos*Phyllocnistis citrella*

CITRICOS

FASE: adulto

Figura 27. Minador de cítricos *Phyllonistis citrella*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

La larva ataca a hojas nuevas en las cuales forma galerías o minas que tienen un característico color plateado. La hembra coloca sus huevos cerca de la nervadura central de la hoja. La infestación por este insecto facilita el ingreso de la bacteria que produce la canchrosis de los cítricos.

Acaro de la leprosis*Brevipalpus phoenicis*

CITRICOS

FASE: adulto

Figura 28. Acaro de la leprosis *Brevipalpus phoenicis*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Estos ácaros son vectores del virus que produce leprosis en cítricos. Infestan hojas, ramas y frutos. En las hojas producen manchas con el centro de color oscuro rodeado de un halo amarillento. En ataques severos produce la caída de las hojas.

Mosca de los frutos
Anastrepha distincta

VARIOS CULTIVOS
FASE: adulto



Figura 29. Mosca de la fruta *Anastrepha distincta*.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Las moscas adultas colocan sus huevos dentro del fruto, ocasionando pudrición en el sitio de oviposición. Las larvas se alimentan de la pulpa ocasionando pudrición de la misma y pérdida de su valor comercial. Los frutos infestados llegan a caer de la planta.

Beuveria en picudo de palmito
Beuveria bassiana

PALMITO
FASE: adulto



Figura 30. Beauveria Bassiana en picudo.

Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Adulto del picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) atacado por *Beuveria bassiana*

1.6 Conclusión

Se logró establecer e identificar las diferentes plagas y enfermedades presentes en el programa de frutales del ICTA-CISUR-Cuyuta. Generando información útil para la búsqueda de nuevos proyectos de para los diferentes cultivos frutales.

Dentro de las principales enfermedades encontradas tenemos: Mancha Johnston ocasionada por (*Pyricularia grisea*), Mancha diamante (*Cercospora hayi*), Mancha cordana (*Cordana musae*), Antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*), Mancha foliar (*Cercospora sp*), Fumagina (*fumago sp*), Mancha blanca (*Corynesporea cassicola*). Siendo la de mayor incidencia y daño *Colletotrichum gloesporioides*, afectando un mayor número de hospederos.


Dentro de las plagas se pudo determinar que la mosca de la fruta (*Anastrepha distincta*), es la que mayor daño hace, ya que esta ataca directamente los frutos de los diferentes árboles frutales presentes dentro del proyecto de frutales del ICTA-CISUR-CUYUTA.

1.7 Recomendaciones

- Elaborar de un programa de contingencia inmediato para control de plagas y enfermedades, ya que de seguir así el proyecto de frutales, muchos de los ejemplares frutícolas que se encuentran en el proyecto desaparecerán.

1.8 Bibliografía

1. Agrios, G. 1986. Fitopatología. Ed. Limusa. México. 1ra. Reimpresión. Autorizada por Academic Press. Inc. Traducida por Manuel. Guzmán O. 755p.
2. Barnett, H. L. and Hunter. B. B. 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4ta. Edición. Macmillan Publishing Company. New York, Estados Unidos de América. 218 p.
3. BASF. 1983. Plant diseases print film handbook. Editado por BASF. Germany. 190 Films.
4. Commonwealth Mycological Institute. 1987. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria.. Set 1-92 (Nos.1-920).
5. Ellis, M. B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. CAB. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England
6. French, E. y Hebert, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. 1ra. ed., 1a. reimpresión. San José, Costa Rica: IICA. 290 p.
7. Gallo, D; Nakano, O; Neto, S.S; Carvalho, R.P.L; Casadei de Baptista,G; Berti Filho, E; Parra, J.R.P; Zucchi, R.A; Alves, S.B; Vendramin, J.D; Marchini, L.C; Lopes, J.R.S y C. Omoto. 2002. Entomología Agrícola. FEALQ. SP-Brasil. 10: 919 p.
8. Manual de laboratorio. Diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopatógenos. Madrid. España. 485 p.
9. Mont Koc, R. y Fernández Northcote, E. 1986. Fitopatología Agrícola. Enfermedades Bacterianas y Fungosas. Departamento de Sanidad Vegetal – Sección Fitopatología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 229p.
10. Nelson, P. E; Toussoun, T. A. and. Marasas, W.F.O. 1983. Fusarium Species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park and London. 193 p.



CAPITULO II

INVESTIGACIÓN

Caracterización patológica y diagnóstico molecular, de seis cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., aisladas de plantas de mango (*Mangifera indica* L.) y papaya (*Carica papaya* L.), y evaluación de protección cruzada como alternativa de manejo postcosecha, en la estación ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.

Pathological characterization and molecular diagnostic of six strain of the *Colletotrichum gloeosporioides*(Penz.) Penz. & Sacc., isolated from mango plants (*Mangifera indica* L.) and papaya (*Carica papaya* L.) and its evaluation of crossed protection as alternative of management postharvest, in the estation ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.

CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR, DE SEIS CEPAS DEL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., AISLADAS DE PLANTAS DE MANGO (*Manguifera indica* L.) Y PAPAYA (*Carica papaya* L.), Y EVALUACIÓN DE PROTECCIÓN CRUZADA COMO ALTERNATIVA DE MANEJO POST COSECHA, EN LA ESTACIÓN ICTA-CISUR, CUYUTA, ESCUINTLA.

RESUMEN

Los cultivos de mango y papaya son de mucha importancia económica para la población guatemalteca, ya que se perfilan como una de las mejores opciones en la agricultura por el crecimiento de la demanda nacional y por la transformación de la industria post cosecha (Granados Friely 2007). Dentro de los problemas que afectan la producción de ambos frutales destacan las enfermedades que se presentan en el fruto, como la antracnosis, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*.

El trabajo consistió en caracterizar morfológica y patológicamente, seis cepas del hongo *C. gloeosporioides*, así mismo realizar la evaluación de la protección cruzada en frutos de mango y papaya utilizando cepas de *C. gloeosporioides* aisladas en hojas, flores y frutos de las plantaciones de mango y papaya que se encuentran ubicadas en el Centro de Innovación Tecnológica del Sur del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA-CISUR) situada en la aldea Cuyuta, Masagua, Escuintla.

En adición, se realizó el diagnóstico molecular de las cepas aisladas en ambos cultivos, para determinar si las cepas obtenidas en ambos cultivos eran cepas netamente de *C. gloeosporioides*. Para la determinación de la especie de estas cepas, se hizo la amplificación de la región ITS, utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los cebadores universales del gen ADNr 5.8S (ITS1: 5'TCCGT AGGTG AACCT GCGG3' e ITS4: 5'TCCTC CGCTT ATTGA TATGC3'), ya que esta permite la identificación de la especie.

Los resultados obtenidos de la caracterización morfológica, nos muestran las diferencias cualitativas existentes entre cepas, como son las tonalidades en el color y forma micelial de las colonias, así como diferencias de las esporas en cuanto a tamaño y forma, de igual manera los resultados obtenidos en la caracterización patológica nos

dieron los fundamentos necesarios para la evaluación de pruebas como la protección cruzada, en la cual se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que se logró determinar que existe una protección tanto en frutos de mango como en papaya.

Así mismo los resultados del análisis molecular confirmaron que se trata del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc. El cual fue evaluado en protección cruzada.

2.1 Presentación

El estudio de la antracnosis provocada por *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., es importante en la producción de frutales, debido a que el patógeno demerita la calidad de los frutos haciéndoles perder su valor comercial, causando grandes pérdidas económicas para los productores de dichos cultivos.

Guatemala produce Mango con un estimado de 19,381 toneladas métricas anuales y 25,000 toneladas métricas anuales de papaya. (Navas et al., 2007; www.maga.com.gt). Debido a las condiciones de humedad relativa y temperaturas cálidas que prevalecen en las áreas donde se cultivan estas frutas, su producción es afectada por una serie de enfermedades fungosas, la antracnosis ocasionada por *Colletotrichum*, es la que produce mayores pérdidas y disminuye la producción, al afectar partes vegetativas y ocasionar la caída de flores y frutos. Aunque la antracnosis puede ser ocasionada por varias especies, *C. gloesporioides* es la de mayor importancia ya que afecta a un amplio grupo de hospederos en los trópicos y sub trópicos, incluyendo entre estos los cultivos de mango y papaya.

Se ha reportado que un mismo hospedero puede ser infectado por varias especies de *Colletotrichum*, o que una misma especie fúngica puede infectar varios hospederos. El ejemplo típico de este caso lo constituye *C. gloesporioides*, que tiene la capacidad de infectar un gran amplio rango de hospedados y además el daño que este ocasiona varía de una cepa a otra (variabilidad patológica).

En esta investigación se observó que el daño ocasionado por *C. gloesporioides*, parece estar restringido a ciertas familias, géneros o especies de plantas, por ejemplo el ataque de ciertas cepas de *C.gloesporioides*, fue tan específico que se utilizaron para la evaluación de existencia de protección cruzada. En este sentido podemos decir que la especificidad del patógeno por su hospedero y su capacidad de inhibir la infección una cepa con otra al estar juntas es una evidencia de co-evolución entre ambos.

2.2 Planteamiento del problema

El Centro de Innovación Tecnológica del Sur del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA-CISUR- Cuyuta), desarrolla proyectos para la producción de frutales, en los que se encuentran proyectos para la producción de mango y papaya, que son frutales de gran aceptación e importancia económica en Guatemala.

Actualmente las investigaciones realizadas en los programas de frutales en dicho centro, van encaminadas al establecimiento de alternativas de manejo y control de enfermedades que afectan los diferentes cultivos frutales, en especial los cultivos de mango y papaya. En dichas investigaciones se ha observado que el problema principal en estos cultivos es la antracnosis, ocasionada por *Colletotrichum gloesporioides*. El cual afecta tallos, flores, hojas, y frutos, de los cultivos antes mencionados, causando pérdidas, principalmente en la etapa de producción.

Colletotrichum gloesporioides, es el agente causal de pérdidas hasta del 50% en post cosecha, y su manejo se limita casi exclusivamente al uso de fungicidas (12). Por lo que se necesitó caracterizar morfológica y patológicamente las cepas obtenidas en dichos cultivos, realizar un diagnóstico molecular del hongo, para poder constatar que efectivamente se trata de *C. gloesporioides*, y evaluar alternativas de manejo, como es la protección cruzada.

2.3 Marco teórico

2.3.1 Marco conceptual

2.3.a *Colletotrichum spp.*

Colletotrichum, es un hongo fitopatógeno, que tiene un gran rango de hospedantes, entre los cuales se encuentran los frutales como: mango y papaya, este hongo les causa antracnosis en hojas, tallos y frutos, causando pérdidas significativas en post cosecha (1). *Colletotrichum*, se ha clasificado según sus características morfológicas, tales como tamaño y forma de conidias, forma de acérvulos, etc.; pero debido a la gran plasticidad morfológica de las especies de *Colletotrichum*, las técnicas moleculares han sido una herramienta de gran utilidad ya que estas técnicas aportan claridad a la sistemática del hongo(1).

2.3.b Identificación y Reconocimiento de la Antracnosis

De acuerdo con nuestras observaciones y en concordancia con la información consultada registra a la antracnosis, como una enfermedad que en los últimos años ha tenido mucha importancia por su incidencia y severidad en plantaciones de mango y papaya y se le atribuye a *Colletotrichum spp.*, este hongo causa la desintegración de los tejidos. Se observan manchas negras y hundidas en forma de úlcera que aparecen sobre hojas, tallos, flores y frutos (antracnosis). Pueden aparecer rayas de color marrón oscuro en la punta de las hojas (1).

2.3.c Clasificación Taxonómica

La antracnosis es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., que en su forma sexual corresponde a *Glomerella cingulata* (Ston) Spauld & Scherenk. El hongo *C. gloeosporioides* pertenece a la superdivisión Deuteromycotera, clase-forma Coelomycete, orden Melanconiales y familia Melanconiaceae. Se caracteriza porque presenta las conidias hialinas, unicelulares, ovoides u oblongas, ubicadas en una estructura llamada acérvulo. Estos cuerpos son en forma de disco, cerosos,

subepidermales y típicamente oscuros. Además de los conidióforos y conidias, presentan setas en el borde del acérvulo y entre los conidióforos (Dickman, M. B., 2006).

2.3.d Descripción

Enfermedad: Antracnosis

Agente causante: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

Forma asexual: *Glomerella cingulata* (Ston) Spauld & Scherenk.

Super división: Deuteromycotera

Clase forma: Coelomycete

Orden: Melanconiales

Familia: Melanconiaceae

(Agrios et al., 1995)

Colletotrichum y su telemorfo *Glomerella* han estado implicados en enfermedades en plantas (principalmente antracnosis) alrededor del mundo pero especialmente como la causa de los problemas pre-cosecha y post-cosecha en los trópicos. Su habilidad para causar infecciones latentes lo ubica entre los patógenos más importantes de la post-cosecha (25).

Se caracteriza porque presenta las conidias hialinas o transparentes, unicelulares, ovoides u oblongas, ubicadas en una estructura llamada acérvulo. Estos cuerpos son en forma de disco. Además de los conidióforos y conidias, presentan setas en el borde del acérvulo y entre los conidióforos (1).

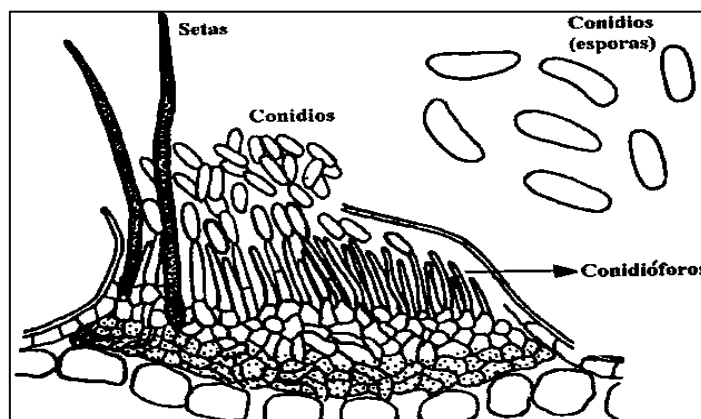


Figura 31. Acérvulo de *Colletotrichum*, Barnett 1998.

Colletotrichum gloeosporioides es un microorganismo importante en la zona tropical. La taxonomía de *Colletotrichum* es confusa, hay cerca de 900 especies descritas o asignadas a *Colletotrichum*. La identificación ha sido estudiada por sus características morfológicas, culturales, especialmente características conidiales, presencia de setas, esclerocios y forma de los apresorios. Las conidias pueden ser cilíndricas o elípticas (4).

2.3.e Condiciones favorables

El proceso infectivo que desarrolla el patógeno causante de la antracnosis es favorecido por altas precipitaciones, alta humedad ambiental y altas temperaturas. Sin embargo, es obvio que cada uno de esos componentes deben estar presentes en niveles óptimos en forma simultánea, ya que con uno solo de ellos que no esté en el rango requerido por el patógeno se afecta negativamente el proceso de infección (4).

Estudios de laboratorio permitieron conocer que la germinación de las esporas es mayor con temperatura de 15 °C y humedad relativa por debajo de 95%; el apresorio o estructura de penetración del hongo se forma 18 horas después bajo estas condiciones. La penetración del apresorio en el tejido vegetal es más eficiente con temperaturas de 25 °C, observándose lesiones a los 5 días. El patógeno penetra directamente o a través de heridas causadas principalmente por insectos. El hongo es favorecido por elevada humedad relativa (más de 82%), alta precipitación y temperaturas oscilantes entre 22 y 32 grados centígrados (1).

En el campo está establecido que la temperatura para la germinación de las esporas del hongo oscila entre 22 y 32 °C con óptima de 25 °C; las esporas presentes en las ramillas o en el suelo son viables después de dos años, en las ramas superiores después de 19 meses y en las hojas caídas en el suelo después de 14 meses. Las condiciones de alta humedad (más de 82%), lluvias frecuentes y la prevalencia del rocío y nubosidad durante los períodos críticos favorecen el desarrollo de la enfermedad e intensidad de los ataques (1).

2.3.f Ciclo Patológico de *Colletotrichum*

El hongo inverna en tallos, hojas y frutos enfermos de las plantas en forma de micelio o espora, en las semillas de las plantas. Sobre los frutos momificados se forman peritecios

en los cuales se forman las ascosporas, los cuales producen infecciones primarias (12). La infección que produce el hongo se lleva a efecto mediante la penetración directa de los tejidos sanos, donde el micelio crece intercelularmente y puede permanecer latente durante cierto tiempo antes de que las células empiecen a colapsarse y pudrirse. El micelio del hongo produce entonces acervulos y conidias inmediatamente por debajo de la cutícula, la cual se rompe y libera los conidios para una vez más iniciar más infecciones (8).

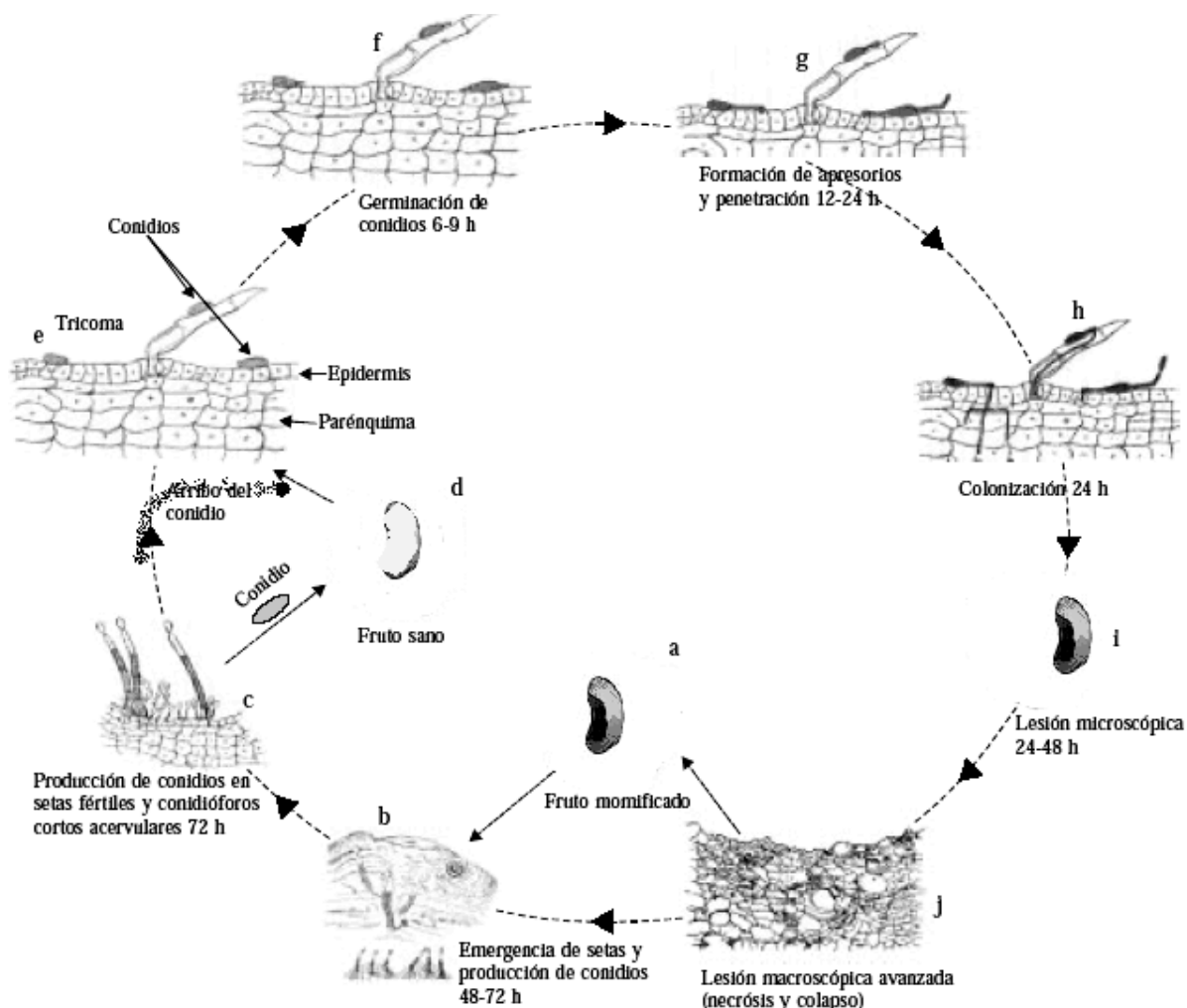


Figura 32. Ciclo de vida de *Colletotrichum*. Agrios 2005.

2.3.g Biología y Ecología de *Colletotrichum gloesporioides*.

Colletotrichum gloesporioides se encuentra en la naturaleza, principalmente en su estado asexual (o fase conidial). El hongo persiste sobre o dentro de semillas, desechos vegetales y malezas hospederas. Se traslada distancias cortas por medio del salpique de agua, corrientes de aire e insectos. Frecuentemente es detectado en el suelo (1). Produce unas estructuras en forma de disco, con un diámetro de 300 micras, en forma sub-epidermal en la lesión llamados acervulos; estos cuerpos presentan varias espinas o setas con cuatro a nueve micras de diámetro y menos de 100 micras de longitud, los cuales están ubicados al borde o entre la masa de conidióforos simples y alargados; las conidias son hialinas, unicelulares y de forma ovoide; estas conidias tienen una vacuola cerca del centro y miden 2.5 a 5.5 por 11 a 20 micras. Bajo ciertas condiciones ambientales las setas pueden no presentarse; si se presentan, esta característica puede servir para diferenciarlo de otro género bastante similar, conocido como *Gloeosporium* (26).

Colletotrichum gloesporioides causa enfermedades en follaje, flores, inflorescencias y frutos. Puede ser un patógeno vigoroso de tejidos jóvenes en vías de desarrollo que causan manchas negras a las hojas y flores. En los tejidos maduros su desarrollo es menor, permaneciendo latente hasta que cambios fisiológicos o daños estimulen una fase agresiva. Éstos difiriendo de las características epidemiológicas permiten al hongo causar una serie de enfermedades, a menudo en la misma cosecha. La especie es un saprofito facultativo común y ataca material muerto o dañado de la planta. Frecuentemente puede aislarse del tejido aparentemente saludable (1).

2.3.h Rango de hospederos

Colletotrichum gloesporioides tiene una amplia gama de hospederos, entre los cuales tenemos cultivos de mango y papaya. Sin embargo también es un saprofito facultativo común e invasor secundario de daños en los tejidos y puede constituirse en un parásito agresivo (14).

2.3.i Distribución Geográfica de *Colletotricum gloeporioides*

Colletotrichum gloesporioides es un hongo cosmopolita, aunque es más abundante en los trópicos y subtropicos que en las zonas templadas.

2.3.j Penetración del hongo

Colletotrichum gloeosporioides, ataca los tejidos vegetativos, tiene una gran habilidad para penetrar la cutícula directamente, usualmente la penetración ocurre después de formarse el apresorio (29). Existen tres mecanismos propuestos de penetración de cutícula, estos son exclusivamente basados en la fuerza mecánica, secreción de enzimas o una combinación de ambos procesos. Hay suficiente evidencia que indica que *C. gloeosporioides* puede ejercer las fuerzas suficientes para penetrar cutícula (8).

Alternativamente la penetración puede requerir a las enzimas disolver o ablandar la cutícula. Por consiguiente en la actualidad la evidencia indica que para algunas especies de *Colletotrichum* se requiere la penetración de cutícula, aunque para otras parece ser lograda por medios mecánicos (8).

El apresorio es importante en la penetración porque es el sitio donde se acumulan las enzimas (celulasas, cutinasas y pectinasas), que degradan la pared celular de la planta, la temperatura ideal para la formación de apresorio oscuro es de 25°C, ello ocurre después de colocarse a incubar. La formación de hifas infecciosas, la cual se mide en el laboratorio cuando la hifa penetra una membrana de celulosa, se da en mayor proporción a temperatura de 25°C, y comienza a las 30 h. las temperaturas comprendidas entre 10°C y 12.5°C reducen la formación de apresorio oscuros (4).

2.3.k Sintomatología

En el cultivo de papaya, el hongo afecta cualquier órgano de la planta; no obstante el daño es mayor cuando infecta flores y frutos. Sobre las flores causa lesiones oscuras irregulares y caída de las mismas. En frutos inmaduros generalmente el hongo permanece latente, y sólo cuando el fruto inicia o llega a la madurez de cosecha evidencia síntomas de la enfermedad.(5) La enfermedad afecta el fruto tanto en el campo como en post cosecha, produciendo manchas acuosas, hundidas y de color marrón oscuro en la superficie, afectando la calidad externa e interna del producto y con ello su valor comercial. El daño consiste en manchas ligeramente hundidas de color negro, que pueden llegar a cubrir todo el fruto. Bajo condiciones favorables al hongo, aparece un polvillo rosado en la superficie

de la lesión, formado por esporas del patógeno. Cuando el ataque ocurre sobre frutos pequeños, estos se momifican y quedan adheridos al árbol. En caso de afectar frutos próximos a recolección, las manchas son pequeñas o aun inexistentes, pero el daño se manifiesta durante el transporte o el almacenamiento (4).

En frutos maduros, los síntomas son fácilmente distinguibles, apreciándose manchas de color marrón oscuro, hundidas en la superficie y acompañadas de cierta emisión de gomas; frecuentemente aparece sobre la superficie del fruto un chorreado oscuro, debido a la acción de las esporas al ser arrastradas por el agua (rocío o lluvias); en su interior, los frutos presentan áreas negruzcas que inicialmente son blandas, pero que después se endurecen; finalmente estos órganos se pudren totalmente y se desprenden del árbol con facilidad(1).



Figura 33. A. Fruto de papaya infectado por *Colletotrichum* B. flor de paya infectadas con *Colletotrichum*
Fuente: Fotografía tomada en campo por Ariel Oswaldo Reyes Donis.

En mango, el patógeno afecta hojas, ramitas, inflorescencias y frutos, ocasionando sobre este último severos daños que demeritan su calidad, lo que repercute en la pérdida de valor comercial y disminución de los rendimientos por unidad de superficie. En las hojas viejas se presentan manchas pardo oscuras o marrón con halo amarillo; las hojas jóvenes muestran manchas pequeñas de coloración oscura y de forma irregular que aparecen del ápice y los bordes hacia el centro de la lámina foliar y que pueden unirse para formar áreas necróticas más extensas que provocan su caída o impiden el desarrollo de la fotosíntesis, también es notoria la presencia de puntos necróticos en las nervaduras y encurvamiento y necrosis de los ápices (23).



Figura 34. Flor, hojas y fruto de mango con *Colletotrichum*.
Fuente: Fotografía tomada en campo por Ariel Oswaldo Reyes Donis, 2007.

En frutos maduros los síntomas son fácilmente distinguibles, apreciándose manchas de color marrón oscuro, ligeramente hundidas en la superficie y acompañadas de cierta emisión de goma; en ocasiones aparece sobre la epidermis del fruto un chorreado oscuro debido a la acción de las esporas del hongo al ser arrastradas por el agua. Por efectos de las toxinas del hongo, la pulpa se deteriora (pudrición) presentando áreas negruzcas que en sus inicios son blandas, pero que después se endurecen; finalmente los frutos se pudren totalmente y se desprenden de la planta con facilidad (23).

2.3.1 Manejo en Postcosecha

La antracnosis genera daños en postcosecha que alcanzan hasta un 50% de frutos manchados, lo cual se refleja en pérdidas económicas, para el agricultor. Los daños en postcosecha ocurren por lo siguiente: 1. Alta presión de enfermedad en el campo; 2. Mala selección de frutos favoreciendo la entrada de frutos enfermos en las cajas u otro tipo de empaque; y 3. Presencia de infecciones quiescentes o latentes provenientes del campo, que sólo se hacen evidentes cuando los frutos maduran en condiciones de humedad y altas temperaturas de almacenamiento (23).

2.3.m Protección cruzada

La protección cruzada se basa en el efecto de protección que ejerce las cepas de un hongo poco virulento sobre otras cepas más agresivas del mismo hongo, pero su

utilización es controversial debido al riesgo que representa introducir de forma deliberada un hongo debido a la gran capacidad de cambio que estos poseen ya que este podría evolucionar a razas más agresivas y resistentes. En los últimos tiempos se ha demostrado que la característica de resistencia ha sido una herramienta muy eficaz para controlar los problemas producidos por hongos fitopatógenos, aunque está exenta de problemas, ya que no siempre es posible encontrar una resistencia natural eficaz en la especie que nos interesa o en una especie relacionada compatible, que nos permita su incorporación (3).

2.3.n Purificación de hongo

La purificación de hongos consiste en separar completamente el hongo que se va a estudiar de otros que se desarrollen junto a él y que posiblemente lo estén contaminando, así mismo separa todo tipo de bacteria que pueda crecer con el hongo. La purificación garantiza que el hongo a estudiar estará completamente libre de contaminantes o sea 100% puro (1).

2.3.ñ Cultivos monospóricos

Se le llaman cultivos monospóricos a aquellos cultivos generados artificialmente a partir de una espora obtenida de un cultivo purificado (1).

2.3.o Marcadores moleculares

El ADN es la molécula que contiene el código genético, siendo sus propiedades el reflejo directo de la identidad genotípica y fenotípica de cada organismo, es muy utilizada en la identificación de especies debido a que está menos influenciada por los efectos del ambiente, y además la interpretación de los resultados es más objetiva.

Los marcadores moleculares de DNA son muy estables y por lo tanto útiles en la identificación de especies y poblaciones (17).

Las pruebas moleculares tradicionales como análisis de PCR, ADNr, secuencia de genes entre otros, han sido satisfactorias para diferenciar entre las especies y subespecies de *Colletotrichum*. Estas técnicas son herramientas consideradas adecuadas para la identificación taxonómica de las especies de *Colletotrichum*.

2.3.p Secuenciación de ADN

La secuenciación consiste en determinar la secuencia de nucleótidos del amplímero obtenido por PCR, de esta forma se pueden detectar diferencias en uno o unos pocos pares de bases que afecten incluso a un solo nucleótido dentro de todo el amplímero.

2.3.q Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés)

La PCR es una reacción enzimática en cadena que conlleva a la amplificación de secuencias de ADN (Acido Desoxirribonucleico) específico de un ADN molde determinado. Además del ADN molde, se necesitan dos oligonucleicos o primers de 20 nucleótidos de longitud, cuya secuencia debe ser complementaria al ADN molde. La amplificación se realiza en presencia de dNTPs como sustrato y la reacción es catalizada por la *Taq* polimerasa. La secuencia entre las dos regiones complementarias a los primers es sintetizada al repetir los ciclos, los cuales consisten en una serie de temperaturas a las cuales el ADN es desnaturalizado y los primers se alinean y se lleva a cabo la polimerización de la cadena específica (25).

Una PCR tiene tres fases: Exponencial, lineal y plateau. La fase exponencial es la que ocurre de primero en la PCR en la cual el producto incrementa exponencialmente desde que los reactivos no sean limitantes, la fase lineal se caracteriza por un incremento lineal en el producto a medida que los reactivos en la PCR se vuelven limitantes, la PCR alcanzará la fase plateau durante los últimos ciclos y la cantidad de producto no cambiará debido a que los reactivos se han agotado (28)

2.3.r Espaciadores de transcripción interna (ITS, por sus siglas en inglés)

Las regiones ITS representan solo una parte del genoma, éstas son suficientemente variables para facilitar la separación a nivel de género y son frecuentemente útiles a nivel de especies en los ascomycetes (27).

El ribosoma de los eucariotes posee dos subunidades de ADNr con diferentes gradientes de sedimentaciones: 40S y 60S, el cual está codificado por tres genes, la subunidad grande (28S), la subunidad pequeña (18S) y el gen 5.6S, separados por las regiones de los espaciadores de transcripción interna (ITS). La región de los ITS por el hecho de ser intrones es un área de alta variabilidad al no tener una función biológica aparente y por esto acumula mutaciones neutrales a lo largo del tiempo, lo que permite diferenciar

individuos relacionados genéticamente (6). La región ITS es ahora el fragmento de ADN más secuenciado en hongos.

2.4 Marco referencial

2.4.a Ubicación geográfica

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla, se encuentra localizado en la vertiente sur de la República de Guatemala, en las coordenadas 14° 7', latitud Norte y 71° 09', longitud Oeste (18), inserta en el Parcelamiento Cuyuta, del Municipio de Masagua, Escuintla.

2.4.b Vías de comunicación

El parcelamiento Cuyuta cuenta con una carretera principal que lo comunica con el municipio de Masagua, Puerto de San José y con la cabecera departamental de Escuintla (18).

2.4.c Suelos y topografía

Los suelos del área son de origen aluvial, con drenaje moderado, color café, textura franco – arenosa, espesor del horizonte “A” de 40 a 50 cms., estructura granular con bajo contenido de materia orgánica. Predominan los suelos de clase agrológica I, II y III. El parcelamiento cuenta con relieves casi planos, con desniveles de 3 a 4% (18).

2.4.d Clima y ecología

El clima está comprendido dentro de la zona tropical cálida. La precipitación pluvial promedio anual es de 2,120mm que varía en un rango que va de 1241.2mm a 3,995.2mm, con temperatura mínima de 21°C y máxima de 34°C, la altura sobre el nivel del mar es de 48m. El parcelamiento se encuentra dentro de la zona de vida Bosque Húmedo Subtropical (Cálido) (18).

2.4.e Aspectos Económicos

Puede apreciarse que la explotación de las parcelas es de tres formas: explotación agrícola, ganadera y mixta (18). Dentro de la explotación agrícola el principal cultivo son los árboles frutales.

2.5 Objetivos

2.5.a General

- Establecer la variabilidad del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., en los cultivos de mango y papaya en condiciones del ICTA cuyuta.

2.5.b Específicos

- Caracterizar mediante análisis moleculares y bioensayos como pruebas de patogenicidad, la virulencia de las cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)Penz & Sacc. aislados de mango y papaya.
- Realizar pruebas de infección cruzada en frutos de mango y papaya, y de ser posible, evaluar protección cruzada como alternativa de manejo postcosecha en cultivos de mango y papaya.

2.6 Hipótesis

- *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)Penz & Sacc. tiene una alta variabilidad morfológica y patológica, en mango y papaya en condiciones del ICTA cuyuta.
- Las cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)Penz & Sacc. aisladas de mango y papaya, pueden ser utilizadas en la protección cruzada como alternativa de manejo postcosecha.

2.7 Metodología

2.7.a Caracterización en campo

2.7.b Caracterización de síntomas

Se realizaron recorridos en las plantaciones de mango y papaya ubicadas dentro de la Estación ICTA-CISUR, para observar la presencia de antracnosis en las hojas, flores y frutos, de los cultivos antes mencionados, con el propósito de corroborar la descripción hecha por (Arévalo 2006); en cada cultivo se describieron los síntomas *in situ* presentes en cada uno de los órganos de las plantas, cada descripción fue registrada por medio de fotografías y notas de campo, de esta manera se pudo llevar un control en cuanto a presencia del hongo y árboles muestreados.

2.7.c Caracterización de signos

Para la caracterización de signos se realizaron observaciones por medio de microscopios de campo, se describieron detalladamente los signos presentes en las hojas, flores y frutos de los cultivos antes mencionados.

2.7.d Toma y traslado de material enfermo

Se tomaron muestras de material enfermo de hojas, flores y frutos que de los cultivos de mango y papaya que presentaban síntomas de antracnosis, las cuales se trasladaron al laboratorio en bolsas de plástico, identificadas con datos como procedencia de la muestra, fecha, etc. Estas muestras se conservaron dentro de una hielera.

2.7.e Caracterización en laboratorio

2.7.f Caracterización de síntomas

El material enfermo que provenía del campo se observó bajo el estereoscopio y se describió detalladamente los síntomas macro y microscópicos, tales como: cambios de coloración, presencia de halo, presencia de estructuras reproductivas, manchas, etc. Las muestras vegetales que aún no presentaban estructuras desarrolladas del hongo se colocaron en cámara húmeda, la cual facilitó el desarrollo de estas estructuras

reproductivas. Luego de que se presentaran las estructuras reproductivas se procedió a describirlas.

2.7.g Caracterización de signos

Para la caracterización de los signos, se realizaron cortes y raspados de las áreas en donde había presencia de antracnosis, de las muestras vegetales traídas del campo y las que se colocaron en la cámara húmeda, luego se observaron los montajes hechos bajo el microscópio y se observaron las estructuras del hongo. Se describieron las características de los signos, como: color, conformación; además se tomaron fotografías de los montajes para tener un registro gráfico.

2.7.h Aislamiento y purificación de colonias

2.7.i Siembra en medio de cultivo

Se tomaron fragmentos de material vegetal enfermo (aproximadamente de 1 cm cuadrado), que provenía del campo, estos fragmentos fueron cuidadosamente desinfectados en una batería o tren de desinfección, de la siguiente manera: agua (durante 1 minuto), hipoclorito de sodio al 2% (durante 30 segundos aprox.), agua (durante 1 minuto), alcohol al 70% (durante 30 segundo aprox.), agua (durante 1 minuto), y secado en papel filtro durante 3 minutos aproximadamente. Luego de haber pasado por la batería de desinfección, se colocaron en cajas de petri con medio EMA (Extracto de malta-agar), y se sellaron con parafilm, luego de esto las cajas de petri, las cuales contenían los aislados, fueron colocadas en una incubadora a una temperatura de 25°C.

2.7.j Purificación del hongo

Para la purificación del hongo, se tomaron fragmentos del hongo aislado de aproximadamente el diámetro de un agujero de sacabocados, este fragmento de hongo fue inoculado nuevamente en cajas de petri con medio EMA (extracto de malta agar), sellados con parafilm y colocados en la incubadora a una temperatura de 25° C. el objetivo de la purificación era de aislar al hongo de todo tipo de contaminantes que pueda contener y así garantizar la presencia del hongo en un 100%. Todos estos procedimientos

se realizaron en la cámara de flujo laminar / cámara de transferencia, para garantizar la pureza de los aislamientos.

2.7.k Cultivos monospóricos

De las colonias de *Colletotrichum* seleccionadas, se tomó un acervulo de cada una de ellas y se realizaron suspensiones de esporas. De la siguiente manera un acervulo se colocó en 10ml de agua estéril en un tubo de ensayo el cual se agitó para lograr el desprendimiento de las esporas y de esta manera se obtuvo una suspensión considerada 1:10, para la obtención de la suspensión 1:100, se tomó 1ml de la suspensión 1:10 y se colocó en 9 ml de agua estéril en un tubo de ensayo de esta manera se obtuvo la suspensión 1:100, luego se observaron ambas suspensiones para ver la dispersión de las esporas. Luego a criterio se escogió la suspensión 1:100 ya que ésta presentaba una mayor dispersión de esporas, de la cual se tomaron 50µl (microlitros), esta cantidad se tomó con micro pipeta y se coló en cajas de petri con medio de cultivo EMA*, la gota colocada en la caja de petri se esparció con una varilla de vidrio doblada en triangulo, las cajas ya inoculadas con la suspensión se colocaron en la incubadora a 22° C, luego de 24 horas se observaron filamentos pequeños de micelio los cuales eran colonias creadas a partir de una solo espora de *Colletotrichum*.

2.7.l Diagnóstico molecular

Se realizó el diagnóstico molecular, para confirmar que el hongo utilizado para todas las pruebas fuese *Colletotrichum gloeosporioides*. Para la realización del diagnóstico molecular, se siguió el siguiente protocolo.

Nota: Se trabajaron 14 cepas en total, de diferentes cultivos como: Mango, papaya, guayaba, carambola, aguacate y anona. Ya que los kits para corridas de DNA (Desoxiribonucleico Ácido) por sus siglas en inglés, de *Colletotrichum* vienen para 20 muestras.

2.7.m Cultivo de micelio

Preparación de Extracto Malta-Agua para 14 cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*:

- Se pesaron 3 gramos de Malta, 2 gramos de Dextrosa más 200 ml de Agua destilada, se mezclaron en un matrás y se distribuyó en el autoclave por 15 minutos.

- Se hizo el llenado de 14 frascos de compota con 10 ml aproximadamente del medio en la campana.
- Se sembraron pequeños fragmentos de micelio de cada cepa en los frascos de compota con medio.
- Esperamos que el micelio creciera dentro de los frascos de compota hasta que cubriera la totalidad del medio, esto se da aproximadamente de 3 a 5 días después de haber realizado la siembra.
- Se cosechó el micelio en la campana, esto se hizo extrayendo el micelio de los frascos de compota con el menor contenido de medio de cultivo y se colocaron en pedazos de papel filtro para su secado.
- Se introdujo el micelio cosechado en viales o tubos eppendorf de 1.5 ml, tratando de dejarlo hasta el fondo y fue almacenado en el congelador a -20°C .

2.7.n Liofilización del micelio

- Se extrajeron los tubos eppendorf del congelador y se colocaron rápidamente en un raquix o gradillas (circulares para 7 tubos eppendorf). La liofilización se realizó a 6×10^{-2} mbar a -50°C
- Se colocaron los raquix en la cámara del liofilizador por 15 minutos.
- Se extrajeron los tubos eppendorf contenidos en el raquix y fueron colocados en la campana.

2.7.ñ Procedimiento para la Extracción de DNA (Zolan y Pukkila, 1986)

- Inmediatamente después de liofilizar el micelio, se trituró (pulverizó) el micelio dentro los tubos eppendorf con la ayuda de un pistilo (un pistilo por cepa) y después se agregaron 500 μl del buffer de extracción CTAB 2X
- Los tubos eppendorf se colocaron de nuevo en los raquix para dejarlo en baño María a 65°C por 30 a 50 minutos, este proceso ayudó a la extracción e hidratación de los ácidos nucleicos.

- A los tubos eppendorf se les agregó 500 μ l de Fenolcloroformo-alcohol isoamyl en una relación 1:24:1 a cada muestra. Se agitó vigorosamente a mano hasta formar una emulsión.
- Se centrifugaron los tubos en un micro-centrifugador a 13,000 g por 10 minutos (suficiente tiempo para producir un sobrenadante claro). Usando una puntilla de pipeta desechable, cuidadosamente se removió la capa superior a un tubo eppendorf limpio y rotulado (se evitó tomar material de la interfase, en este caso la capa de micelio formado). Se desechó el contenido del tubo viejo como residuo orgánico.
- Se hizo una re-extracción de muestras una segunda vez, usando ligeramente menos cloroformo-alcohol isoamyl (250 μ l; la mitad del usado la primera vez, se agitó lentamente en forma horizontal). Esta vez hubo menos material emulsificado. Se centrifugó y se extrajo cuidadosamente la capa superior a un tubo limpio y rotulado. (Si se desea ADN extra-limpio se puede repetir el paso de extracción una tercera y aun una cuarta vez hasta que no haya material de interfase y la porción acuosa sea nítida y clara).
- Se agregó 250 μ l isopropanol frío, se tapó y se invirtió mezclando. Para regular las mini preparaciones, se observó la precipitación de hebras blancas (DNA con la presencia de polisacáridos). Al ver un precipitado visible, se colectó e inmediatamente se centrifugaron las muestras por 2 minutos.
- Después de centrifugar se decantó el alcohol sobrenadante y se lavó el precipitado que quedó (de 1 a 5 min) con 100 μ l de EtOH 80% frío. Se removió el alcohol y se secó precipitado completamente en la campana a temperatura ambiente.
- Se agregó 50 μ l EtOH 95% frío mas 25 μ l de acetato de amonio, y se centrifugó por 2 minutos y nuevamente se decantó el sobrenadante.
- Se lavó con 100 μ l de etanol al 95% por 1 minuto y nuevamente se decantó. En este proceso se secaron los tubos eppendorf invertidos por 4 minutos, tratando de que la pelotita de ADN no se deslizará.
- Se agregaron 25 μ l de agua libre de nucleása. Y se almacenó en el congelador a -20°C.

2.7.o Electroforesis

Preparación de Gel de Agarosa 0.8%:

- Se pesaron 1.2 gramos Agarosa mas 150 ml de TAE 2X
- Se hizo una mezcla de ambos en un matras y se calentó en intervalos de tiempo de 30 segundos en el microondas, ésto para lograr una mejor homogenización de la solución.
- Se dejó enfriar la solución a $\pm 30^{\circ}\text{C}$ y se le agregaron 15 μl de Bromuro de Etidio al 10%
- Se vertió la solución de agarosa en la celda de electroforesis, posteriormente se colocaron los 2 peines, y se esperó hasta que gelatinizara luego de esto se agregó el TAE 2X suficiente hasta cubrir parcialmente el gel de agarosa. Se hace la extracción de los 2 peines para que se rellenen de TAE 2X los espacios dejados por los dientes.
- Se sacaron los tubos eppendorf del congelador y se pusieron a descongelar, tratando de homogenizar la muestra de ADN y se cargaron 2 μl de la misma con 3 μl de azul de bromophenol de cada una de las cepas, esto se realizó sobre un pedazo de parafilm, luego se introdujo cuidadosamente en los espacios dejados por los dientes de los peines extraídos, tratando de no romper el gel de agarosa, y para comprobar la corrida de ADN se colocó un comparador de 2 μl de marcador molecular (lader) mas 3 μl de azul de bromophenol.
- Se colocó la tapa de la celda de electroforesis con su respectiva carga eléctrica (+ y -) y se dejó funcionando a 100 Voltios por 30 minutos.
- Extracciones buenas de ADN se caracterizan por la presencia de una banda de ADN distintiva de alto peso molecular con poco o nada de evidencia de productos de degradación de bajo peso molecular. Esto se pudo comprobar extrayendo el gel de agarosa conjuntamente con la cámara de sostén del mismo y colocando solamente el gel en el transluminador (GelDocMeg , por sus siglas en inglés) de rayos UV, en donde se podrá observar dicha banda de ADN.

2.7.p Amplificación por PCR

- De acuerdo al ancho de la banda de DNA se realizaron diferentes diluciones para las 14 cepas de *Colletotrichum* con agua libre de nucleasas. Una dilución de 1:10 nos indicaba 100 dividido 10 igual a 10 y esto es igual a 10 μ l de ADN mas 90 μ l de agua libre de nucleasas. En este caso la dilución más baja es la que formó una banda de ADN muy delgada. Se prepararon diluciones de ADN para obtener una concentración ≥ 100 picomoles para cada muestra.
- En la campana se trabajaron las diluciones y se procedió a elaborar el Master Mix el cual consistía en lo siguiente:

PCR Master Mix	12.5 μ l
Primer 1 (ITS1)	02.5 μ l
Primer 2 (ITS4)	02.5 μ l
H2O libre de Nucleasa	<u>05.5 μ</u>
Total	23 μ l

- En un tubo eppendorf pequeño nuevo y rotulado se agregó 23 μ l Master Mix más 2 μ l de muestra de ADN diluido de cada cepa. Se centrifugó por 15 segundos para deslizar toda la muestra al fondo del tubo.
- Se colocaron los tubos eppendorf en el termociclador (PCR) y se corrió con el programa Rytas, el cual viene programado para amplificar un determinado segmento de DNA por 2:35 horas aproximadamente.
- Para verificar la amplificación correcta de DNA se volvió a preparar el gel de agarosa. En las cepas que no se llevo a cabo la amplificación, se retorno a realizar de nuevo las diluciones hasta la obtención de la amplificación.
- Se utilizaron las siguientes condiciones para amplificación de DNrA 94°C por 3 minutos y 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 50° C por 0.5 minutos y 72° C por minutos enlazados entre si por 7 minutos a 72° C.

2.7.q Sistema de Purificación Directa de DNA a Partir de Amplificaciones de PCR

- Se transfirió una alícuota de 100 μ l de Direct Purification Buffer en un tubo de polipropileno (tubo eppendorf) de 12 por 75 mm o un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Añade 30 a 300 μ l del producto de PCR (en nuestro caso 42 μ l por ser escaso). Y se agitó brevemente.
- Se añadió 1 ml de resina y se colocó en un vórtex brevemente 3 veces en el lapso de un minuto.
- Materiales que se tuvieron a mano: -Isopropanol 80% frío (grado reactivo), Agua bidestilada libre de nucleasa y jeringas de 3 ml con Luer-Lok.
- Para cada producto de PCR se preparó una mini columna Wizard. Se removió y se dejó a un lado el embolo de la jeringa de 3 ml. Se unió la mini columna a la jeringa a través de la rosca Luer-Lok.
- Se introdujo la mezcla ADN/resina dentro de la jeringa. Y se insertó el émbolo lentamente y suavemente empujando para que la mezcla entre en la columna.
- Se quitó la jeringa de la mini columna, y removió de nuevo el émbolo. Se puso de nuevo la jeringa a la mini columna. Se pipeteó 2 ml de isopropanol 80% para lavar la columna. Se insertó otra vez en el émbolo en la jeringa, y se empujó suavemente el isopropanol a través de la mini columna para lavar el ADN.
- Se removió la jeringa de la mini columna y se transfirió esta última a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugó la mini columna por 2 minutos a 10,000 x g para secar la resina.
- Se transfirió la mini columna a un nuevo tubo de micro centrífuga. Y se aplicó 50 μ l de agua bidestilada libre de nucleasa a la mini columna y se dejó reposar por 1 minuto (el ADN permanecerá intacto en la mini columna hasta por 30 minutos). Se centrifugó la mini columna por 20 segundos a 10,000 x g para sacar (elute) el ADN.
- Se removió y descartó la mini columna. El ADN purificado se almacenó en el tubo de micro centrífuga de 4 a -20°C.

2.7.r Secuenciación de las cepas de *Colletotrichum*

- La secuenciación de las cepas de *Colletotrichum* se realizó en Corea a través de una solicitud de secuenciación (ver anexo) que se obtiene en la página de macrogen <http://www.macrogen.com> y posteriormente se realizó el trámite de papelería para el envío de las muestras purificadas de ADN contenidas en los tubos eppendorf.
- Los resultados de cada una de las cepas consta de un archivo en Chromas, PDF, Documento de texto, entre otros. Tanto para las reacciones ITS1 & ITS4. Se verificó la secuenciación y se alinearon las secuencias obtenidas, utilizando el oligonucleico ITS1 e ITS4 en el programa BLAST, posteriormente se utilizó el programa Chromas para editar las secuencias ITS1 en el caso que fuera necesario.
- Para la edición de las secuencias se empleó el Programa Chromas, posteriormente se ingresaron las secuencias editadas en el programa Fasta de Macrogen para la identificación de las especies.
- Para la alineación de la secuencias se utilizó ClustalX, para la edición de las secuencias alineadas se utilizó Seaview y para la construcción del árbol filogenético se empleó el programa MEGA 4 y TreeView para realizar mejoras en la construcción del árbol.

2.7.s Pruebas de patogenicidad

Para esta fase, se colectaron frutos de mango y papaya en fase de desarrollo, que presentaban más o menos el 50% de madurez, así como hojas jóvenes de los mismos los frutos fueron trasladados al laboratorio y desinfectados con alcohol al 50% por treinta segundos, hipoclorito de sodio 1% por un minuto sumergiendo el fruto y lavados con agua destilada esterilizada. En el caso de los frutos, la inoculación en condiciones de laboratorio se realizó con una suspensión de esporas del hongo, se realizaron pruebas con una suspensión 1:10.

2.7t Prueba de patogenicidad en mango

Prueba 1. Se inocularon 3 puntos con *Colletotrichum* aislado de mango, y 3 puntos se inocularon con agua estéril. A este fruto se le hizo una lesión en cada punto de referencia en donde se inoculó *Colletotrichum* aislado de mango.

Prueba 2. Se inocularon 3 puntos con *Colletotrichum*, y 3 puntos se inocularon con agua estéril. A este fruto se le hizo una lesión en cada punto de referencia en donde se inoculó *Colletotrichum* aislado de mango.

Prueba 3: Se inocularon 3 puntos con *Colletotrichum*, y 3 puntos se inocularon con agua estéril. A este fruto no se le hizo ningún tipo de lesión en cada punto de referencia en donde se inoculó *Colletotrichum* aislado de mango.

2.7u Prueba de patogenicidad en papaya

Prueba 1. Se inocularon 4 puntos con *Colletotrichum*, y 4 puntos se inocularon con agua estéril. A este fruto no se le hizo ningún tipo de lesión en cada punto de referencia en donde se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya.

Prueba 2. Se inocularon 4 puntos con *Colletotrichum*, y 4 puntos se inocularon con agua estéril. A este fruto no se le hizo ningún tipo de lesión en cada punto de referencia en donde se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya.

Prueba 3. Se inocularon 4 puntos con *Colletotrichum*, y 4 puntos se inocularon con agua estéril. A este fruto se le hizo una lesión en cada punto de referencia en donde se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya.

2.7.v Pruebas de patogenicidad en hojas de papaya

Prueba 1. Se marcaron 4 puntos de referencia a los cuales se les inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya y 4 puntos de referencia a los que se les inoculó agua estéril, y se colocaron al igual que los frutos en cajas plásticas.

- Prueba 2. Se marcaron 4 puntos de referencia a los cuales se les inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya y 4 puntos de referencia a los que se les inoculó agua estéril, y se colocaron al igual que los frutos en cajas plásticas.
- Prueba 3. Se marcaron 4 puntos de referencia a los cuales se les inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya y 4 puntos de referencia a los que se les inoculó agua estéril, y se colocaron al igual que los frutos en cajas plásticas.
- Prueba 4. Se marcaron 4 puntos de referencia a los cuales se les inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya y 4 puntos de referencia a los que se les inoculó agua estéril, y se colocaron al igual que los frutos en cajas plásticas.
- Prueba 5. Se marcaron 4 puntos de referencia a los cuales se les inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya y 4 puntos de referencia a los que se les inoculó agua estéril, y se colocaron al igual que los frutos en cajas plásticas.
- Prueba 6. Se marcaron 4 puntos de referencia a los cuales se les inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya y 4 puntos de referencia a los que se les inoculó agua estéril, y se colocaron al igual que los frutos en cajas plásticas.

2.7.w Pruebas de infección cruzada

2.7.x Prueba de infección cruzada en mango

- Prueba 1. Se inocularon tres puntos con *Colletotrichum* aislado papaya sacada directamente de la caja de petri. Se le hizo una lesión.
- Prueba 2. Se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya sacado directamente de la caja y se inoculó en tres puntos. A este fruto no se le hizo lesiones en los puntos de referencia en el fruto.
- Prueba 3. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya. se le hizo una lesión.
- Prueba 4. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya.
- Prueba 5. Se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya y se inoculó en tres puntos de referencia. A este fruto se le hicieron lesiones en los puntos de referencia.

Prueba 6. Se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya y se inoculó en tres puntos de referencia, a este fruto se le hicieron lesiones en los puntos de referencia.

2.7.y Prueba de infección cruzada en papaya

Prueba 1. Se inocularon cuatro puntos con *Colletotrichum* aislado mango. No se le hizo lesión.

Prueba 2. Se inocularon cuatro puntos con *Colletotrichum* aislado mango. No se le hizo lesión.

Prueba 3. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó *Colletotrichum* aislado de mango.

2.7.z Evaluación de protección cruzada.

2.7.a.a Evaluación de protección cruzada en mango

Prueba 1. Se inocularon tres puntos con *Colletotrichum* aislado papaya sacado directamente de la caja de petri y a las 72 horas se le inoculó el de mango sacado directamente de la caja de petri, estas repeticiones se hicieron con una lesión en los puntos de referencia en el fruto.

Prueba 2. Se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya sacado directamente de la caja y se inoculó en tres puntos 72 horas después se inoculó el de mango sacado directamente de la caja de petri, a este fruto no se le hizo lesiones en los puntos de referencia en el fruto.

Prueba 3. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó colocando primero el inóculo de *Colletotrichum* aislado de papaya. 72 horas después el de mango.

Prueba 4. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó colocando primero el inóculo de *Colletotrichum* aislado de papaya. 72 horas después el de mango.

Prueba 5. Se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya, se inoculó en tres puntos de referencia 72 horas después se inoculó el de mango.

Prueba 6. Se inoculó *Colletotrichum* aislado de papaya, se inoculó en tres puntos de referencia 72 horas después se inoculó el de mango.

2.7.a.b Evaluación de protección cruzada en papaya

Prueba 1. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó colocando primero el inóculo de *Colletotrichum* aislado de mango. 72 horas después el de papaya.

Prueba 2. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó colocando primero el inóculo de *Colletotrichum* aislado de mango. 72 horas después el de papaya.

Prueba 3. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó colocando primero el inóculo de *Colletotrichum* aislado de mango. 72 horas después el de papaya.

Prueba 4. Se realizó sin lesiones en los puntos de referencia y se inoculó colocando primero el inóculo de *Colletotrichum* aislado de mango. 72 horas después el de papaya.

Prueba 5. Se inoculó *Colletotrichum* aislado de mango. 72 horas después se inoculó el de papaya.

Prueba 6. Se inoculó *Colletotrichum* aislado de mango. 72 horas después se inoculó el de papaya. no se le hicieron lesiones en los puntos de referencia.

2.8 Recursos

2.8.a Materiales

- Materiales para colecta, preservación y transporte de muestras
- Materiales para cultivo *in Vitro*
- Medios de cultivo generales y específicos para el crecimiento del hongo.
- Claves para la identificación de la especie *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc que incluyan dibujos y fotografías microscópicas.

2.8.b Equipo

- Autoclave y horno microondas
- Baño de María
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Guantes
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Estereoscopios y microscopios
- Cámara digital
- Recipientes para colecta de muestras
- Campana de flujo laminar
- Incubadora
- Micro pipetas 10, 100 y 1000 L con sus respectivas puntas.

2.9 Cronograma de ejecución del proyecto de investigación

			2 0 0 7																																											
			FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO				AGOSTO				SEPTIEMB				OCTUBRE				NOVIEMB							
No	ACTIVIDAD	RESPONSABLE	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
1	Elaboración de Plan de Investigación	Antonio Hernández					X	X	X																																					
2	Primera revisión	Dr. David Monterroso Ing. Gustavo Álvarez					X																																							
3	Recolección material enfermo	Ariel O. Reyes Donis					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																				
4	Colocación en cámara húmeda	Ariel O. Reyes Donis					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																				
5	Obtención de aislamiento del hongo	Ariel O. Reyes Donis									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																				
6	Obtención de cultivos monospóricos	Ariel O. Reyes Donis													X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																				
7	Caracterización <i>in Vitro</i>	Ariel O. Reyes Donis																	X	X	X	X	X	X	X	X																				
8	Pruebas de patogenicidad	Ariel O. Reyes Donis																					X	X	X	X																				
9	Pruebas de Protección Cruzada	Ariel O. Reyes Donis																									X	X	X	X	X	X	X	X												
10	Sistematización de la información	Ariel O. Reyes Donis																													X	X	X	X	X	X	X	X								
11	Elaboración de informe final	Ariel O. Reyes Donis																																					X	X	X	X				
			2 0 0 8																																											
			ENERO				FEBRERO				MARZO																																			
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4																																
11	Curso-Taller de Marcadores Moleculares	Dr. Graciela Palacios Dr. Francisco Holguín					X	X	X	X																																				
12	Diagnóstico molecular de las cepas	Ariel O. Reyes Donis ECOSUR					X	X	X	X																																				
13	Elaboración de informe final	Ariel O. Reyes Donis									X	X	X	X																																

El Curso Taller de Marcadores Moleculares se realizó en ECOSUR, Tapachula, México.

2.10 Resultados

2.10.a Caracterización en campo

Los resultados obtenidos en la caracterización de síntomas tanto para mango como para papaya, coinciden con los síntomas descritos por (Arévalo 2006)

2.10.b Caracterización de síntomas

2.10.c Cultivo de mango

Se observaron manchas de forma irregular en frutos, en hojas, flores y pedúnculos de mango, al avanzar la enfermedad se pudo observar la presencia de una zona perimetral clorótica en hojas. Estando ya el hongo en un estado muy avanzado se observó como llega a necrosar la lámina foliar de las hojas, momificar los frutos y flores.



Figura 35. Síntomas ocasionados por *C. gloesporioides*: A--flores. B-hojas. C-frutos. D-pedunculos. De mango
Fuente: Fotografía tomada en campo por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.d Cultivo de papaya

Se observó que las hojas, y flores de papaya son dañadas por *C. gloesporioides* en un menor porcentaje respecto a los frutos de los mismos, se observaron manchas de forma irregular en frutos de papaya, en hojas se observaron unos pequeños puntos de color marrón estos puntos se encontraban en las nervaduras de las hojas de papaya, en las

flores se presentaban manchas como quemaduras que avanzaban desde el borde de las mismas hacia en centro de estas.



Figura 36. Síntomas ocasionados por *C. gloesporioides*, A y B – hojas; C y D – Flor de papaya.
Fuente: Fotografía tomada en campo por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.e Caracterización de signos

En mango se observaron estructuras reproductivas del hongo con mayor claridad en las hojas, mientras que en el cultivo de papaya se observó en los frutos.



Figura 37 Signos de *C. gloesporioides* en hojas de mango
Fuente: Fotografía tomada en campo por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007



Figura 38 Signos de *C. gloesporioides* en frutos de papaya.
Fuente: fotografía tomada en campo por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.f Toma y traslado de material enfermo

Los frutos de papaya al ser incubados en cajas de plástico presentaron estructuras reproductivas como se ve en la figura siguiente se hizo la caracterización de signos y síntomas en el laboratorio.



Figura. 39 Frutos de papaya colocados en cámara húmeda para el desarrollo de estructuras reproductivas.
Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.g Caracterización en laboratorio

2.10.h Caracterización de síntomas

2.10.h.a Cultivo de mango

La sintomatología que se pudo observar en las hojas de mango fueron manchas de color marrón claro de forma irregular, estas manchas por lo general se inician en el borde de la lámina foliar y van hacia el centro de la misma, a medida de que la enfermedad avanza en la hoja las manchas se van tornando de color marrón oscuro y de mayor tamaño cubriendo casi por completo la hoja, ocasionalmente se rompe el tejido foliar por causa de la antracnosis que presenta.

En el caso de las flores se observó necrosis iniciada en la parte central de esta, llegando a determinar que esta es una causa del aborto de las mismas y pérdida de frutos tiernos. Todo debido al ataque desmedido de *Colletotrichum*.

En los frutos se presentan manchas de color marrón claro que van cambiando de tonalidad a marrón oscuro a medida que la enfermedad avanza en algunos casos es tanto el avance de la enfermedad que esta llega a momificar los frutos.



Figura 40 Síntomas ocasionados por *C. gloesporioides* en frutos de mango. Colectados en Cuyuta
Fuente: Fotografía tomada en laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.h.b Cultivo de papaya

En los frutos maduros de papaya se observaron lesiones profundas de forma circular, de color marrón claro y de aspecto lechoso, con forme la enfermedad iba avanzando estas se tornaban de color marrón oscuro, las lesiones son de diversos tamaños.



Figura 41. Síntomas ocasionados por *C. gloesporioides* en fruto de papaya. Colectados en Cuyuta. Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.i Caracterización de signos

2.10.i.a Cultivo de Mango

En las hojas de mango se observó la presencia de manchas de color marrón oscuro casi negras, en dichas manchas se pudo observar la presencia de acérvulos, los cuales emergen del tejido epidermal, los acérvulos cuando están en proceso de esporulación forman pequeños grupos de masa conidiales, se pudo observar estas masas que eran de color crema/rosado, en la mayoría de ocasiones estas masas conidiales podían observarse a simple vista



Figura 42. Hoja de mango con presencia de acérvulos en las manchas producidas por *C. gloeosporioides*
Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007



Figura 43. Hoja de mango con presencia de acérvulos en esporulación
Fuente: Fotografía tomada en el laboratorio de Fitopatología FAUSAC por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Luego de determinada la existencia de acérvulos se realizaron cortes de la hojas y se observaron en el microscopio, pudiendo observar los componentes de la estructura reproductiva, dentro de estas se forman los acérvulos, conidióforos y conidias.

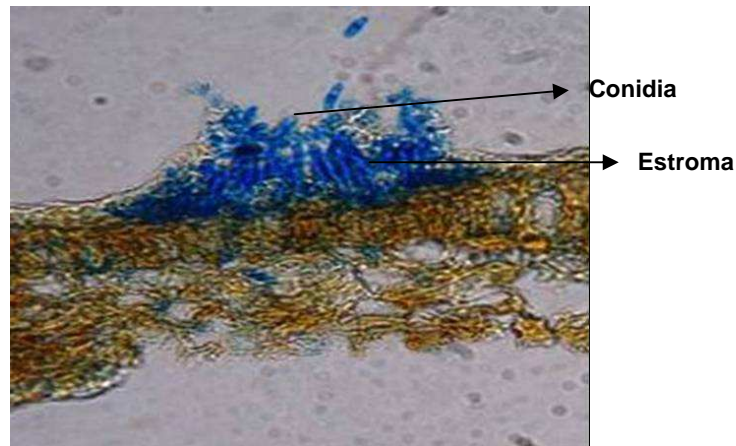


Figura 44 Acérvulo de *Colletotrichum*, en hojas de mango

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.i.b Cultivo de papaya

En el fruto de papaya se pudo observar hundimientos circulares, de color rosado/crema, estos hundimientos corresponden a la presencia de *Colletotrichum*, se determinó que sobre estos hundimientos crece una masa de color rosado/crema, la cual es consecuencia de la esporulación del agente patógeno.

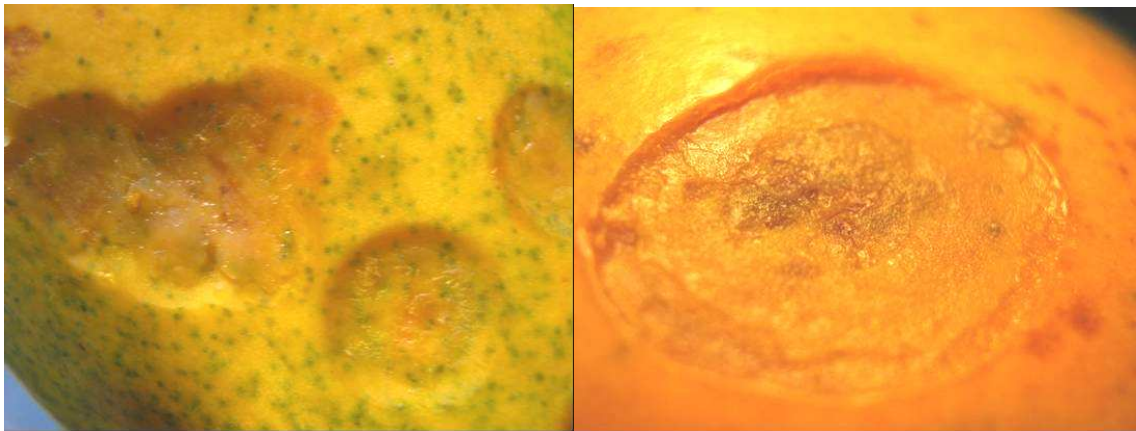


Figura 45. Signos ocasionados por *C. gloesporioides* en fruto de papaya

Fuente: Fotografía tomada en Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.j Obtención de aislamientos de *Colletotrichum*

2.10.k Siembra en medio de cultivo

Se aisló *Colletotrichum* de las muestras provenientes del campo, estas luego de dos días de inoculadas presentaron crecimiento micelial, del cual se realizaron montajes para

verificar si en verdad correspondía a *Colletotrichum*, y en verdad si fue micelio de *Colletotrichum*, el cual posteriormente fue purificado y sacado los cultivos monospóricos.

2.10.l Purificación del hongo

Se logró aislar al hongo de todo tipo de contaminantes que pudieran haber afectado el proceso de caracterización del mismo. Todos estos procedimientos se realizaron para garantizar la pureza de los aislamientos.

2.10.m Cultivos monospóricos

Dos o tres días después de inoculadas las cajas de petri se presentaron pequeñas colonias formadas a partir de una solo espora de *Colletotrichum*.



Figura 46. Realización de cultivos monospóricos

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología de la FAUSAC, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

2.10.n Caracterización morfométrica:

2.10.ñ Cepas provenientes de Mango

2.10.ñ.a CAFMC1 (*Colletotrichum gloesporioides* aislado de fruto de mango cepa 1).

MICELIO

- Micelio de color blanco a grisáceo oscuro
- Micelio sub-aéreo
- Micelio abundante
- Setas ausentes
- Crecimiento moderado de 4-5.5 mm/día

ESPORAS

- Formación abundante de masas conidiales
- Crecimiento sonado de conidias
- Masas conidiales de color naranja
- Conidiosoma escaso de color salmón

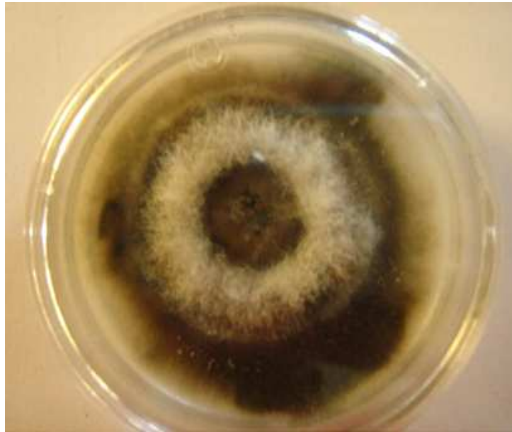


Figura 48. Colonia de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de fruto de mango, cepa 1

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008



Figura 47. Conidias de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de fruto de mango, cepa 1

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008

Tabla 1. Dimensiones de conidias de *C. gloesporioides* aisladas de mango

Dimensión de conidias		
No.	Largo (µm)	Diámetro (µm)
1	16.00	4.57
2	15.43	5.14
3	13.71	4.80
4	13.71	5.03
5	11.43	5.71
6	14.17	5.49
7	13.49	5.26
8	15.09	5.37
9	14.74	5.03
10	13.49	5.49
11	15.89	4.80
12	12.00	5.49
13	13.49	5.03
14	15.09	5.60
15	14.40	5.83
16	15.89	5.14
17	12.80	5.49
18	12.46	5.60
19	15.09	5.71
20	14.06	5.60
\bar{x}	14.12	5.31

2.10.ñ.b CAFIMC2 (*Colletotrichum gloesporioides* aislado de flor de mango cepa 2).

MICELIO

- Micelio de color blanco a grisáceo oscuro
- Micelio sub-aéreo
- Micelio abundante
- Setas ausentes
- Crecimiento moderado de 4-5.5 mm/día

ESPORAS

- Formación abundante de masas conidiales
- Crecimiento sonado de conidias
- Masas conidiales de color naranja
- Conidiosoma escaso de color salmón

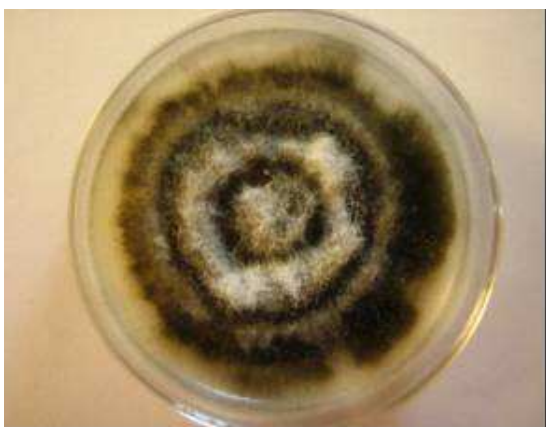


Figura 49 Colonia de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de flor de mango cepa 2

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008



Figura 50 Conidias de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de flor de mango, cepa 2

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008

Tabla 2. Dimensiones de conidias de *C. gloesporioides* aisladas de mango

Dimensiones de conidias		
No.	Largo (µm)	Diámetro (µm)
1	14.86	5.71
2	14.86	4.57
3	14.86	5.14
4	12.57	4.57
5	12.00	5.71
6	14.29	5.49
7	15.09	5.71
8	13.71	5.60
9	14.29	5.71
10	13.26	5.60
11	14.86	5.71
12	12.00	5.49
13	13.49	5.26
14	15.09	5.49
15	12.80	5.14
16	14.51	4.80
17	15.31	4.69
18	13.60	5.71
19	12.00	5.60
20	15.20	5.71
\bar{x}	13.93	5.37

2.10.ñ.c CAPMC3 (*Colletotrichum gloesporioides* aislado de pedúnculo de mango cepa 3).

MICELIO

- Micelio de color blanco a grisáceo oscuro
- Micelio sub-aéreo
- Micelio abundante
- Setas ausentes
- Crecimiento moderado de 5-6.5 mm/día

ESPORAS

- Formación abundante de masas conidiales
- Crecimiento sonado de conidias
- Masas conidiales de color naranja
- Conidiosoma escaso de color salmón

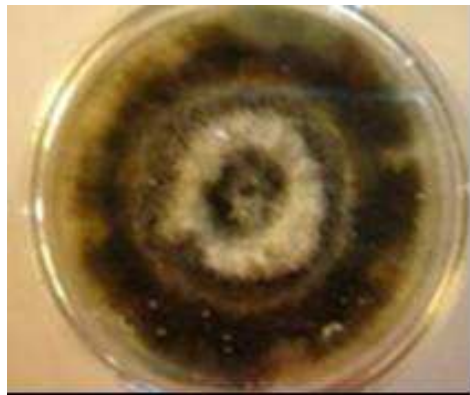


Figura 51 Colonia de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de pedúnculo de mango cepa 3
Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008



Figura 52 Conidias de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de pedúnculo de mango cepa 3
Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008

Tabla 3. Dimensiones de conidias de *C. gloesporioides* aisladas de mango

Dimensiones de conidias		
No.	Largo (µm)	Diámetro (µm)
1	9.14	5.71
2	15.77	4.80
3	13.14	4.57
4	6.86	4.57
5	16.00	5.26
6	10.29	5.71
7	13.71	5.49
8	8.00	5.49
9	13.71	5.71
10	15.31	5.60
11	13.49	5.14
12	13.94	5.71
13	16.11	5.60
14	11.66	4.80
15	13.60	5.49
16	12.46	5.71
17	10.17	5.60
18	13.94	5.71
19	15.89	5.49
20	13.14	5.71
\bar{x}	12.82	5.39

2.10.ñ.d CAHMC4 (*Colletotrichum gloesporioides* aislado de hoja de mango cepa 4).

MICELIO

- Micelio de color blanco a grisáceo oscuro
- Micelio sub-aéreo
- Micelio abundante
- Setas ausentes
- Crecimiento moderado de 5-6.5 mm/día

ESPORAS

- Formación abundante de masas conidiales
- Crecimiento sonado de conidias
- Masas conidiales de color naranja
- Conidiosoma escaso de color salmón



Figura 53 Colonia de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de hoja de mango cepa 4

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008



Figura 54 Conidias de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de hoja de mango cepa 4

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008

Tabla 4. Dimensiones de conidias de *C. gloesporioides* aisladas de mango

Dimensiones de conidias		
No.	Largo (µm)	Diámetro (µm)
1	13.83	4.34
2	18.40	4.57
3	6.86	4.80
4	13.60	4.57
5	12.80	5.14
6	12.00	8.00
7	15.43	4.57
8	12.00	4.80
9	8.91	4.46
10	15.09	4.69
11	13.14	4.46
12	14.63	4.80
13	8.57	5.83
14	16.00	4.80
15	14.74	4.34
16	12.34	4.80
17	13.14	4.57
18	15.09	5.71
19	16.23	5.49
20	10.06	5.14
\bar{x}	13.14	4.99

2.10.o Cepas provenientes de Papaya

2.10.o.a CAFrPC1 (*Colletotrichum gloesporioides* aislado de fruto de papaya cepa 1).

MICELIO

- Micelio de color blanco Micelio sub-aéreo
- Micelio abundante
- Setas presentes
- Crecimiento rápido de 5-6.5 mm/día

ESPORAS

- Formación abundante de masas conidiales
- Masas conidiales de color naranja
- Conidiosoma escaso de color salmón



Figura 55. Colonia de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de fruto de papaya cepa 1

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008



Figura 56 Conidias de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de fruto de papaya cepa 1

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008

Tabla 5. Dimensiones de conidias de *C. gloesporioides* aisladas de papaya

Dimensiones de conidias		
No.	Largo (µm)	Diámetro (µm)
1	20.80	4.00
2	10.29	5.71
3	13.71	5.71
4	13.14	5.49
5	11.43	5.71
6	9.37	5.60
7	8.00	5.83
8	16.57	5.49
9	14.63	5.14
10	17.14	5.49
11	16.00	5.71
12	13.49	5.71
13	8.57	5.60
14	15.77	5.71
15	13.14	5.60
16	7.77	5.71
17	16.00	5.60
18	14.74	5.83
19	13.14	5.26
20	11.31	5.71
\bar{x}	13.25	5.53

2.10.o.b CAFPC2 (*Colletotrichum gloesporioides* aislado de flor de papaya cepa 2).

MICELIO

- Micelio de color blanco
- Micelio sub-aéreo
- Micelio abundante
- Setas presentes
- Crecimiento rápido de 5-6.5 mm/día

ESPORAS

- Formación abundante de masas conidiales
- Masas conidiales de color naranja
- Conidiosoma escaso de color salmón



Figura 57 Colonia de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de flor de papaya cepa 2

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008



Figura 58 Conidias de *Colletotrichum gloesporioides* aislado de flor de papaya cepa 2

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008

Tabla 6. Dimensiones de conidias de *C. gloesporioides* aisladas de papaya

Dimensiones de conidias		
No.	Largo (µm)	Diámetro (µm)
1	9.14	5.71
2	15.77	4.80
3	13.14	4.57
4	6.86	4.57
5	16.00	5.26
6	10.29	5.71
7	13.71	5.49
8	8.00	5.49
9	13.71	5.71
10	15.31	5.60
11	13.49	5.14
12	13.94	5.71
13	16.11	5.60
14	11.66	4.80
15	13.60	5.49
16	12.46	5.71
17	10.17	5.60
18	13.94	5.71
19	15.89	5.49
20	13.14	5.71
\bar{x}	12.82	5.39

2.10.p Pruebas de patogenicidad

Con la realización de las pruebas de patogenicidad tanto en frutos como en hojas de mango y papaya, se pudo comprobar que la sintomatología observada en campo, se repite de igual manera que la realizada en el laboratorio en condiciones controladas. Se pudo observar también cómo es el proceso infeccioso de *Colletotrichum* en hojas como en frutos.

2.10.q Pruebas de patogenicidad en mango

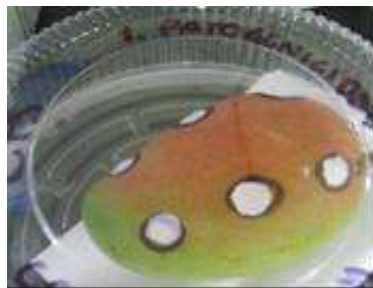
Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos de mango.

2.10.r Pruebas de patogenicidad en frutos de mango:

La sintomatología presentada al inicio de la infección fue presencia de pústulas de color negro y forma redonda, debido a las condiciones de humedad que se le dieron a los frutos fue favorable para el desarrollo del hongo, presentándose aparición de signos como acérvulos y el desarrollo de manchas negras que se fueron haciendo más grandes conforme el hongo se desarrollaba. Se pudo observar que *Colletotrichum* es un hongo muy agresivo en los frutos de mango ya que consumió rápidamente los frutos de mango. En el caso de las pruebas 1, 2 y 3; se pudo observar que 72hrs después de inoculado *Colleotrichum* éste presentó rápidamente manchas negras productos de la infección ocasionada por *Colletotrichum*, los frutos se monitorearon hasta por 162hs, tiempo en el cual se observaron manchas negras en los puntos de inóculo, mientras que los puntos testigo a los que se les inoculó agua estéril permanecieron sin presencia de antracnosis. Tomando en cuenta estos resultados podemos decir que *Colletotrichum gloesporioides* tiene un alto nivel de patogenicidad. Y una habilidad impresionante de dispersarse por todo el fruto por medio de los exudados de éste, ya que se comprobó que en las gotas exudadas por los frutos al ser infectados por *Colletotrichum gloesporioides* tenían esporas de este hongo, por lo que hacía mas fácil su dispersión.



Recolección de frutos De mango



Prueba 1. Fruto de mango inoculado con *Colletotrichum* aislado de mango



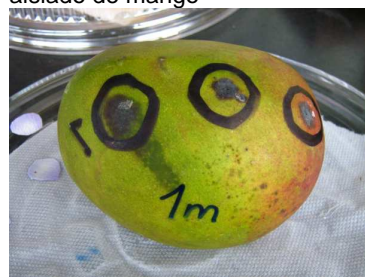
Prueba 2. Fruto de mango inoculado con *Colletotrichum* aislado de mango



Prueba 3 Fruto de mango inoculado con *Colletotrichum* aislado de mango



Prueba 4. Fruto de mango inoculado con *Colletotrichum* aislado de mango.



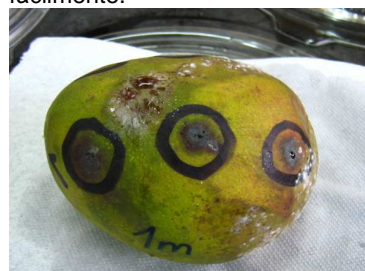
Prueba 1. Se pudo observar como luego de 72 hrs. de inoculado *Colletotrichum* en mango este presentó manchas negras de aproximadamente 2 cm de diámetro, a medida de que el hongo se va desarrollando estas manchas crecen hasta destruir el fruto. El hongo puede penetrar muy fácilmente.



Prueba 1 .Fruto de mango inoculado con *Colletotrichum* aislado de mango. 72 hrs. Después de inoculado



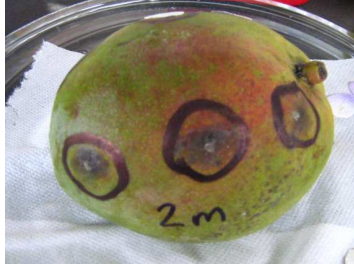
Prueba 1. Se observó que 96 hrs. después de inoculado *Colletotrichum* este presentó un crecimiento acelerado, aprovechando la madurez del fruto ya que este comenzó a exudar líquidos dulces de los cuales el hongo se aprovecha para su sobrevivencia.



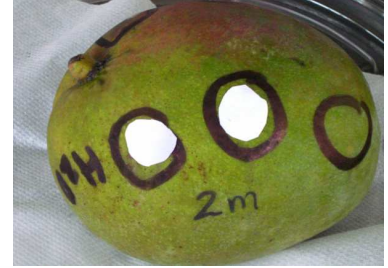
Prueba 1. Se observó que 120 hrs. después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto presentó apariencia flácida, y muchos exudados producto de la presencia de *Colletotrichum* el fruto comienza a podrirse, estando así el fruto dio lugar a la presencia de otros agentes infecciosos secundarios, como se pudo observar con la aparición de micelio no propio de *Colletotrichum*.



Prueba 1. Se observó que 162 hrs. después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto presentó una muy mala apariencia, se pudrió casi por completo, producto del ataque del hongo.



Prueba 2. Se pudo observar como luego de 72 hrs. de inoculado *Colletotrichum* en mango este presentó manchas negras de aproximadamente 2 cm de diámetro, a medida de que el hongo se va desarrollando estas manchas crecen hasta destruir el fruto.



Prueba 2. Se pudo observar como luego de 72 hrs. los puntos en los cuales se inoculó agua estéril aun siguen sin presencia alguna de *Colletotrichum*



Prueba 2. Se observó que 96 hrs. después de inoculado *Colletotrichum* este presentó un crecimiento acelerado, aprovechando la madurez del fruto ya que este comenzó a exudar líquidos dulces de los cuales el hongo se aprovecha para su sobrevivencia



Prueba 2. Se pudo observar como luego de 96 hrs. los puntos en los cuales se inoculó agua estéril aun siguen sin presencia alguna de *Colletotrichum*



Prueba 2. 120 hrs. después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto presentó apariencia flácida, y muchos exudados, el fruto comenzó a pudrirse, estando así el fruto dio lugar a la presencia de otros agentes infecciosos secundarios, los cuales aceleraron la descomposición.



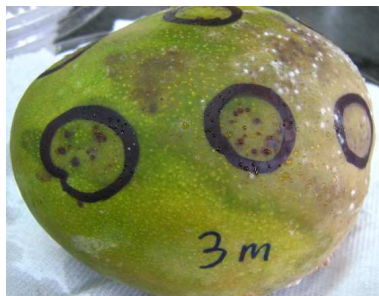
Prueba 2. Se observó que 162 hrs. después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto se pudrió casi por completo, producto del ataque del hongo



Prueba 3. Se pudo observar como luego de 72 hrs. de inoculado *Colletotrichum* en mango este presentó manchas pequeñas y dispersas, a medida de que el hongo se va desarrollando estas manchas crecen hasta destruir el fruto.



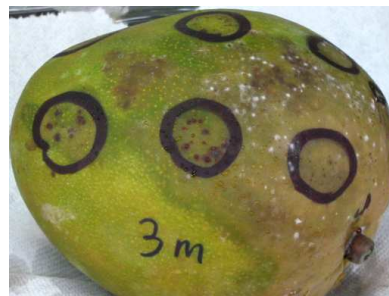
Prueba 3. Se pudo observar como luego de 72 hrs. los puntos en los cuales se inoculó agua estéril aun siguen sin presencia alguna de *Colletotrichum*.



Prueba 3. Se observó que 96 hrs. después de inoculado *Colletotrichum* este presentó un crecimiento muy lento, el fruto comenzó a exudar líquidos dulces de los cuales el hongo aprovecha para su sobrevivencia



Prueba 3. Se pudo observar como luego de 96 hrs. los puntos en los cuales se inoculó agua estéril aun siguen sin presencia alguna de *Colletotrichum*, aunque el fruto se comenzó a poner flácido debido a la aparición de una mancha de color café, no característica de *Colletotrichum*



Prueba 3. 120 hrs. después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto presentó apariencia flácida, y muchos exudados, el fruto comenzó a podrirse, estando así el fruto dio lugar a la presencia de otros agentes infecciosos secundarios, como se pudo observar con la aparición de micelio no propio de *Colletotrichum*.



Prueba 3. Se observó que 162 hrs. después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto se pudrió casi por completo, producto del ataque del hongo. Y otros agentes infecciosos.

2.10.s Pruebas de patogenicidad en papaya

Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos y hojas jóvenes de papaya

2.10.t Pruebas de patogenicidad en frutos de papaya

La sintomatología presentada al inicio de la infección fue presencia de hundimientos de color rosado/naranja y forma redonda, por las condiciones de humedad que se le dieron a los frutos, fue favorable para el desarrollo del hongo, presentando aparición de signos como micelio y masas conidiales, que se iban haciendo más grandes conforme el hongo se desarrollaba y consumía el fruto. Como se pudo observar en las pruebas realizadas, *Colletotrichum gloeosporioides* se presenta no necesariamente al inicio, como se observó en la prueba 1 en la cual 48hrs después de inoculado el hongo no se veían indicios de

este, pero si de otros patógenos, al llegar a las 120 hrs. de inoculado el hongo, se presentaron hundimientos en todo el fruto, característicos de *Colletotrichum gloesporioides*. En las pruebas 2 y 3 respectivamente, los frutos presentaron daños ocasionados por *Colletotrichum gloesporioides* 48 hrs después de inoculados. Se presentaron hundimientos en todo el fruto tanto en los inóculos de *C. gloesporioides* como en los puntos de inóculo de agua, el hongo se disperso por todo el fruto a consecuencia de los exudados que presentaban los frutos ya que se pudo determinar que estas gotas de exudados contenían esporas de *Colletotrichum*,. Los frutos se monitorearon por 120 hrs. Tiempo en el cual se observó que no solamente había presencia de *Colletotrichum* sino además habían otros agentes infecciosos como *Rhizopus* esto se debió a que el fruto al ser infectado por *Colletotrichum* se vuelve vulnerable al ataque de otros agentes infecciosos secundarios..



Prueba 1. Fruto de papaya inoculado con *Colletotrichum* aislado de papaya.



Prueba 2. Fruto de papaya inoculado con *Colletotrichum* aislado de papaya



Prueba 3. Fruto de papaya inoculado con *Colletotrichum* aislado de papaya.



Prueba 1. 48 hrs. Después de la inoculación el fruto no presentó daño alguno ocasionado por el hongo, tanto el punto inoculado con *Colletotrichum* como los de inóculo de agua.



Prueba 1. 72 hrs. Después de la inoculación el fruto no presentó daño alguno ocasionado por el hongo, tanto el punto inoculado con *Colletotrichum* como los de inóculo de agua. Aunque si presentó exudados blancos como goma de diversos puntos del fruto,



Prueba 1. 120 hrs. Después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto presentó apariencia hundimientos en todo el fruto, estando así el fruto dió lugar a la presencia de otros agentes infecciosos secundarios.



Prueba 2. 48 hrs. Después de la inoculación el fruto presentó daño ocasionado por el hongo, tanto el punto inoculado con *Colletotrichum* como los de inóculo de agua. Al parecer éste se dispersó por todo el fruto debido a la humedad tanto de la caja como la del fruto.



Prueba 2. 72 hrs. Después de la inoculación el fruto se vio muy dañado por el hongo, tanto el punto inoculado con *Colletotrichum* como los de inóculo de agua. Este presentó exudados blancos como goma de diversos puntos del fruto,



Prueba 2. 120 hrs. después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto presentó apariencia hundimientos en todo el fruto, estando así el fruto dio lugar a la presencia de otros agentes infecciosos secundarios, como se pudo observar con la aparición de micelio no propio de *Colletotrichum*.



Prueba 3. 48 hrs. Después de la inoculación el fruto presentó daño ocasionado por el hongo, este se comenzó a dispersar por todo el fruto debido a la humedad tanto de la caja como la del fruto.



Prueba 3. 72 hrs. Después de la inoculación el fruto se vio muy dañado por el hongo, tanto el punto inoculado con *Colletotrichum* como los de inóculo de agua. Este presentó micelio tanto de *Colletotrichum* como de otros patógenos, debido a las múltiples lesiones que *Colletotrichum* dejó fue más fácil para otros agentes infecciosos atacar al fruto.



Prueba 3. 120 hrs. después de inoculado *Colletotrichum*, el fruto presentó apariencia hundimientos en todo el fruto, estando así el fruto dio lugar a la presencia de otros agentes infecciosos secundarios, como se pudo observar con la aparición de micelio no propio de *Colletotrichum*.

2.10.u Pruebas de patogenicidad en hojas de papaya

Los síntomas vistos en las hojas de papaya fueron muy irregulares, debido a que las hojas de papaya son muy frágiles se comenzaron a marchitar, por lo que no se distinguió bien el crecimiento de *Colletotrichum*, así mismo por las condiciones de humedad las hojas comenzaron un proceso acelerado de descomposición aunque si hubo aparición de micelio de *Colletotrichum*, como se pudo observar al hacer un montaje en el microscopio.



Prueba 1: Hoja de papaya



Prueba 2: Hoja de papaya



Prueba 3: Hoja de papaya



Prueba 4: Hoja de papaya



Prueba 5: Hoja de papaya



Prueba 6: Hoja de papaya



Prueba 1: Hoja de papaya inoculada con *Colletotrichum* aislado de Papaya



Prueba 2: Hoja de papaya inoculada con *Colletotrichum* de papaya



Prueba 3: Hoja de papaya inoculada con *Colletotrichum* de papaya



Prueba 4: Hoja de papaya inoculada con *Colletotrichum* de papaya



Prueba 5: Hoja de papaya inoculada con *Colletotrichum* de papaya



Prueba 6: Hoja de papaya inoculada con *Colletotrichum* de papaya



Prueba 1: 48 hrs se observó que la hoja presentó una apariencia de descomposición y una coloración verde musgo, con mal olor.



Prueba 2: 48 hrs se observó que la hoja presentó una apariencia de descomposición y una coloración verde musgo, presentó mal olor.



Prueba 3: 48 hrs se observó que la hoja presentó una apariencia de descomposición y una coloración verde musgo, con mal olor. También presentó micelio en las áreas de inoculación debido al papel filtro que se colocó.



Prueba 4: 48 hrs se observó que la hoja presentó una apariencia de descomposición y una coloración verde musgo, y micelio de color blanco en varias áreas de la hoja tenía mal olor.



Prueba 5: 48 hrs se observó que la hoja presentó una apariencia de descomposición y una coloración verde musgo, con mal olor.



Prueba 6: 48 hrs se observó que la hoja presentó una apariencia de descomposición y una coloración verde musgo, con mal olor.



Prueba 1: 96 hrs La hoja presentó un aspecto deteriorado y marchito se veía de color verde marrón el olor era desagradable y presentaba micelio de color rosado muy pálido de *Colletotrichum*.



Prueba 2: 96 hrs La hoja presentó un aspecto deteriorado y marchito se veía de color verde marrón el olor era desagradable similar al de tabaco mojado y presentó micelio de color rosado muy pálido en algunas zonas.



Prueba 3: 96 hrs La hoja presentó un aspecto deteriorado y marchito se veía de color verde marrón el olor es desagradable, en algunas zonas se presentó micelio de *Colletotrichum*.



Prueba 4:96 hrs La hoja presentó un aspecto deteriorado y marchito se veía de color verde marrón el olor era muy desagradable hubo presencia de micelio de *Colletotrichum* y otros agentes infecciosos.



Prueba 5:96 hrs La hoja presentó un aspecto deteriorado y marchito se veía de color verde marrón el olor también era desagradable, también hubo presencia de micelio de color rosado muy pálido, de *Colletotrichum*.



Prueba 6:96 hrs. La hoja presentó un aspecto deteriorado y marchito se veía de color verde marrón el olor era desagradable.

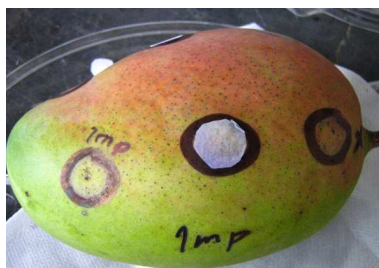
2.10.v Pruebas de infección cruzada

Los resultados obtenidos en las pruebas de infección cruzada fueron de gran utilidad, ya que de aquí se originó el punto de partida para la realización de la prueba de protección cruzada en ambos cultivos, como se pudo observar los frutos de mango al ser inoculados con *Colletotrichum* aislado de papaya, no desarrollaron problema alguno en lo que es su tiempo de vida de anaquel, así como los de papaya, al ser inoculados con *Colletotrichum* aislado de mango no desarrollaron problemas con *Colletotrichum* inoculado. Hay que tomar en cuenta que los frutos que se utilizaron tenían mas del 50% de madurez por lo que su vida de anaquel es menor, al no presentar ambos frutos indicios de la enfermedad se procedió a declarar la protección cruzada, ya que *Colletotrichum* fue selectivo en cuanto al hospedero que se trató.

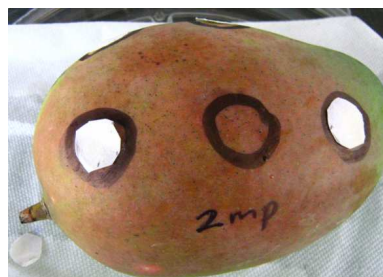
2.10.w Prueba de infección cruzada en mango

Durante la prueba no se presentaron síntomas de *Colletotrichum* en los frutos, durante el tiempo que se estipuló como tiempo de anaquel del fruto este no presentó daño alguno de antracnosis, lo que indicó que *Colletotrichum* aislado de papaya fue selectivo en cuanto a su hospedero, este no se adaptó al fruto de mango por lo que no pudo ejecutar su ciclo biológico y destruir el mango como se observó anteriormente en las pruebas de

patogenicidad con el hongo aislado de mango. Como se pudo observar en las pruebas no se evidenciaron síntomas y signos de *Colletotrichum gloesporioides* ya las cepas de *C. gloesporioides* aisladas de mango y papaya son muy selectivas en cuanto a su hospedero alterno.



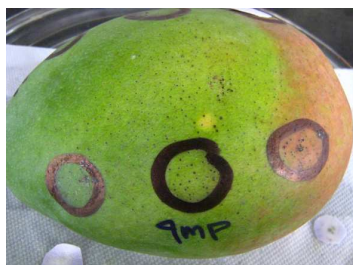
Prueba 1. Se observó que 96 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aún no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*



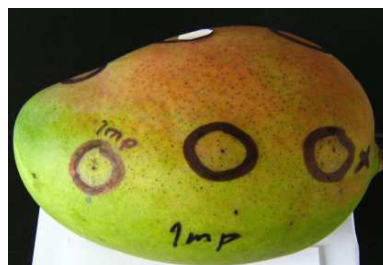
Prueba 2. 96 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aun no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. Tanto en los puntos de inóculo del hongo como en los de inóculo de agua



Prueba 3. Se observó que 96 hrs. Después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aun no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. Su coloración era agradable. Aún estando el fruto lesionado el hongo no se desarrollo.



Prueba 4. Se observó que 96 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aún no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*.



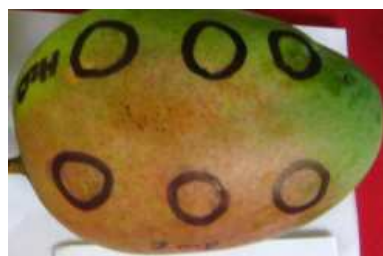
Prueba 1. Se observó que 144 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aun no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. El hongo fue muy selectivo ya que no se desarrollo aun estando el fruto lesionado.



Prueba 1. Se observó que 192 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aún no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*.



Prueba 2. 144 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba



Prueba 2. 192 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba



Prueba 3. Se observó que 144 hrs. después de inoculado el fruto aun

su apariencia sana y consistencia firme.



Prueba 3. Se observó que 192 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aún no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. Su coloración era agradable. Aun estando e fruto lesionado el hongo no se desarrolló. La mancha negra que se observó sobre el fruto, no era *Colletotrichum*. Era otro agente infeccioso que comenzó a actuar ya que el fruto ya estaba muy maduro

su apariencia sana y consistencia firme.



Prueba 4. Se observó que 144 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aún no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. Aunque este comenzó a madurar no se puso flácido ni de mal aspecto

presentaba su apariencia sana y consistencia.



Prueba 4. Se observó que 192 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aún no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. El hongo no pudo penetrar los frutos de mango ya que este fue muy selectivo en su hospedero

2.10.x Prueba de infección cruzada en papaya

Durante la prueba no se presentaron síntomas de *Colletotrichum* en los puntos de referencia que se hicieron en los frutos, aunque se presentaron lesiones en otras partes de los frutos en los cuales no estaba inoculado *Colletotrichum* de mango. Durante el tiempo que se estipuló como tiempo de anaquel del fruto este no presentó daño alguno de antracnosis, lo que indicó que *Colletotrichum* aislado de papaya fue selectivo en cuanto a su hospedero, este no se adaptó al fruto de mango por lo que no pudo ejecutar su ciclo biológico y destruir el mango como se observó anteriormente en las pruebas de patogenicidad.



Prueba 1. Se observó que 96 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aun no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. Aunque este exudo líquidos los cuales le sirvieron de alimento a otros agentes infecciosos



Prueba 1. 120 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aunque comenzó a expeler un olor algo desagradable, producto del ataque de otros agentes infecciosos, pero no de *Colletotrichum*



Prueba 1. Se observó que 144 hrs. después de inoculado la presencia de micelio de color blanco y signos de *Colletotrichum* en la parte del pedúnculo del fruto, aquí no se inoculó *Colletotrichum*, el hongo permaneció latente hasta este momento en donde ataco al fruto



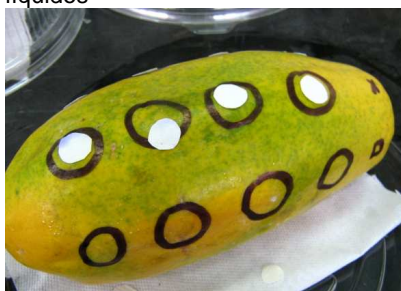
Prueba 2. Se observó que 96 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aún no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. Aunque este exudo líquidos



Prueba 2. 120 hrs. después de inoculado el fruto aún presentaba su apariencia sana y consistencia firme aunque comenzó a expeler un olor algo desagradable



Prueba 2. Se observó que 144 hrs. después de inoculado que el fruto no presentó síntomas de *Colletotrichum* aunque siguió el mal olor. Esto producto de la madurez inevitable que presentó el fruto.



Prueba 3. Se observó que 96 hrs. después de inoculado el fruto aun presentaba su apariencia sana y consistencia firme aún no habían aparecido síntomas de *Colletotrichum*. Aunque este exudo líquidos



Prueba 3. 120 hrs. después de inoculado el fruto presentaba apariencia firme aunque comenzó a expeler un olor algo desagradable. Y se produjo micelio el cual no era de *Colletotrichum*, debido a las condiciones de humedad que se le dieron tubo lugar la aparición de otros agentes infecciosos.



Prueba 3. Se observó que 144 hrs. después de inoculado que el fruto no presentó síntomas de *Colletotrichum* aunque siguió el mal olor. Esto producto de la madurez inevitable que presentó el fruto. Y presencia de micelio no propio de *Colletotrichum*

2.10.y Evaluación de protección cruzada

Las pruebas de protección en mango como en papaya, dieron un resultado positivo, es decir las cepas de *Colletotrichum* aisladas de mango y de papaya, inhiben su desarrollo la una con la otra, creando así un efecto favorable para el manejo postcosecha de estos frutos, por lo que ésta medida es factible utilizarla en el manejo de estos frutos para evitar daños ocasionados por antracnosis durante su vida de anaquel. Por medio del cual se podrá tener frutos sanos y vistosos para el consumo nacional. Se pudo inducir la protección cruzada tanto en frutos de mango como de papaya por lo que se deduce que estas indujeron a los frutos a producir sustancia fenólicas y fitoalexinas dando como resultado una resistencia del fruto hacia este patógeno. Esta resistencia se logró gracias a que al inocular en caso de mango, las cepas aisladas de papaya 72 horas antes de inocular las de mango, en frutos de mango, la cepa de papaya al no poder infectar al fruto de mango se convierte en una acepa poco virulenta causando una reacción de hipersensibilidad, induciendo la producción de fitoalexinas y sustancias fenólicas, las cuales provocan la muerte de las células infectadas y por consiguiente la del patógeno. O bien puede ser éste un indicio de que ambas cepas entraron en un proceso de coevolución.

2.10.z Evaluación de protección cruzada en mango

En los frutos de mango la prueba de protección cruzada dio positivo, se pudo controlar la aparición de antracnosis mediante el uso de cepas inoculadas de mango y papaya en el mismo fruto y el mismo punto, durante el periodo de observación que fue equivalente a la vida de anaquel de este fruto, se vio el fenómeno de cómo ambas cepas inhibieron su crecimiento la una con la otra, se creó un control biológico de la cepa de mango sobre la cepa de papaya, ya que al inocular 72 horas antes el *Colletotrichum* aislado de papaya se está dando la ventaja para que este se adaptara al fruto y comenzara a destruirlo pero no fue así. Al cabo del tiempo se vio como empezaron a aparecer otros agentes infecciosos causando daños en los frutos.



Materiales empleados en la prueba de protección cruzada en frutos de mango.



Cajas estériles de plástico, para almacenar los frutos.



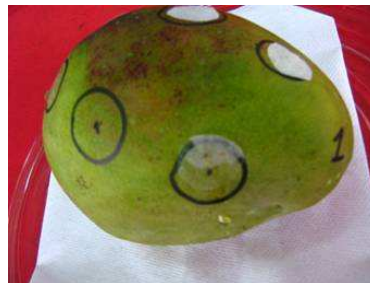
Frutos de mango seleccionados para la prueba.



Áreas marcadas en donde se hará el inóculo.



Colocación de papel filtro en el inóculo.



Prueba 1: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 96 hrs. los puntos negros son las lesiones de la aguja.



Prueba 2: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 96 hrs. no se evidencia presencia de antracnosis, los frutos siguen sanos.



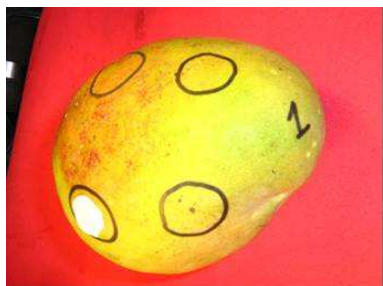
Prueba 3: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 96 hrs.



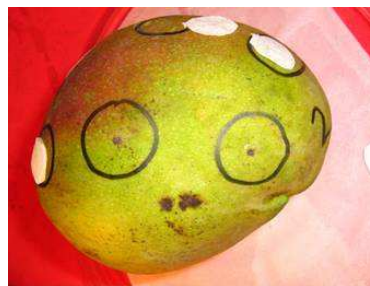
Prueba 4: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 96 hrs.



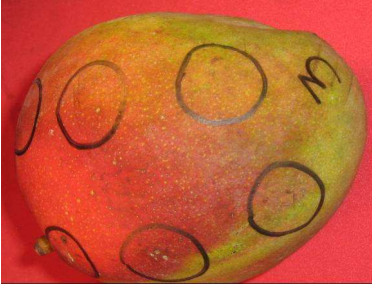
Prueba 5: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 96 hrs. los puntos negros son las lesiones de la aguja.



Prueba 1: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 264 hrs. el mango se ve de color mas amarillo.



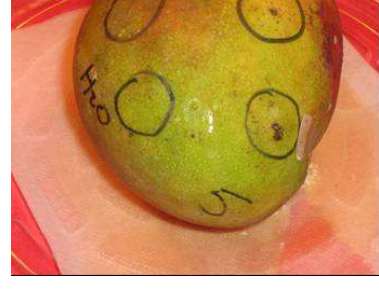
Prueba 2: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 264 hrs. no se evidencia presencia de antracnosis, los frutos siguen sanos.



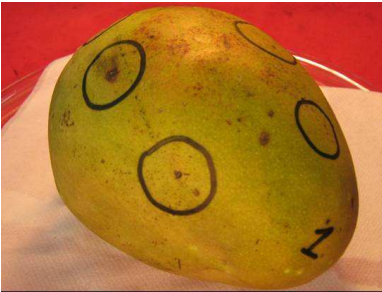
Prueba 3: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 264 hrs.



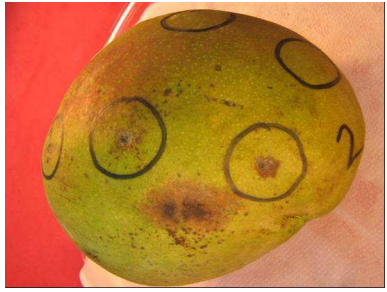
Prueba 4: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 264 hrs.



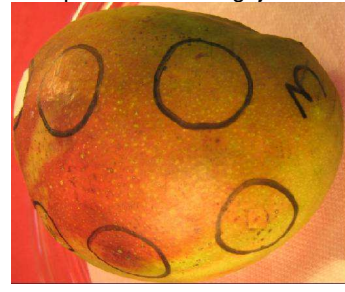
Prueba 5: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 264 hrs. los puntos negros son las lesiones de la aguja, el punto más grande que se ve en el primer círculo es una herida mayor que se ocasionó por una error en la manipulación de la aguja.



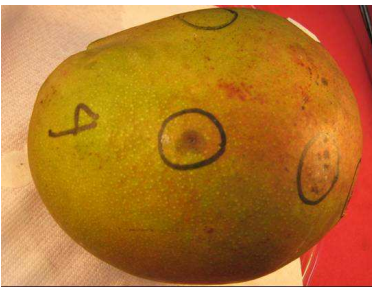
Prueba 1: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 384 hrs. los puntos negros son las lesiones de la aguja. El fruto tiene consistencia flácida y coloración verde marrón.



Prueba 2: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 384 hrs. la mancha marrón sigue creciendo pero no es el crecimiento que identifica a *Colletotrichum*, las manchas que se ven en los círculos de inóculo aparentemente se están formando debido a que el fruto esta lesionado en esa parte y se esta poniendo flácido color verde marrón.



Prueba 3: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 384 hrs. No se ve evidencia de presencia de *Colletotrichum*, el fruto ya tiene consistencia flácida de coloración no muy atractiva, se que esta iniciándose el proceso de descomposición del fruto.



Prueba 4: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 384 hrs. Se ve una mancha en el círculo.



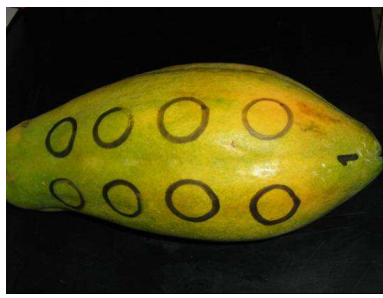
Prueba 5: mango con inóculo de *Colletotrichum* de mango y papaya, a las 384 hrs. los puntos negros son las lesiones de la aguja, el punto más grande que se ve en el primer círculo es una herida mayor que se ocasionó por una falla en la manipulación de la aguja.

2.10.a.a Evaluación de protección cruzada en papaya

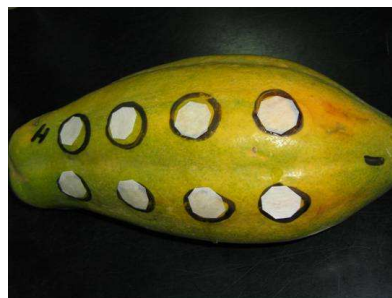
Los frutos de papaya que se utilizaron en la prueba de protección cruzada dio positivo al igual que los de mango, se pudo controlar la aparición de antracnosis mediante el uso de cepas inoculadas de mango y papaya en el mismo fruto y el mismo punto, durante el periodo de observación que fue equivalente a la vida de anaquel de este fruto, se vio el fenómeno de cómo ambas cepas inhibieron su crecimiento la una con la otra, se creó un control biológico de la cepa de papaya sobre la cepa de mango, ya que al inocular 72 horas antes el *Colletotrichum* aislado de papaya se estaba dando la ventaja para que este se adaptara al fruto y comenzara a destruirlo pero no fue así. Al cabo del tiempo se vio como empezaron a aparecer otros agentes infecciosos causando daños en los frutos. Además se pudo observar como los frutos se iban madurando, hasta descomponerse dando lugar a la aparición de diversos agentes fitopatógenos, en los puntos en donde se inoculo *Colletotrichum* no hubo aparición de síntomas de antracnosis; pero en el resto de la superficie del fruto sí fue atacada por *Colletotrichum*.



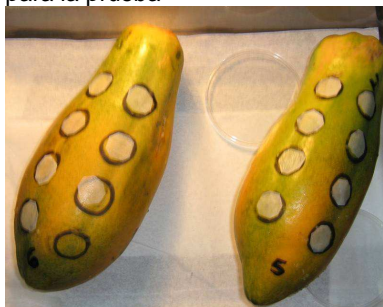
Frutos de papaya seleccionados para la prueba



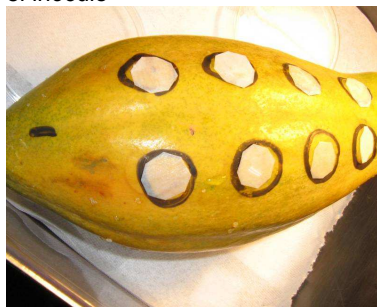
Áreas marcadas en donde se hará el inóculo



Colocación de papel filtro en el inóculo hecho al fruto



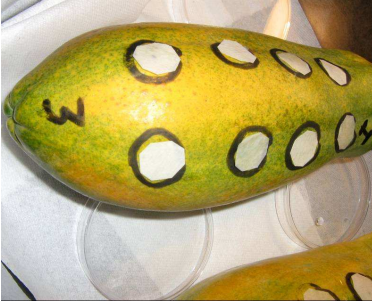
Frutos de papaya con inóculo de mango 72 horas después de inoculado.



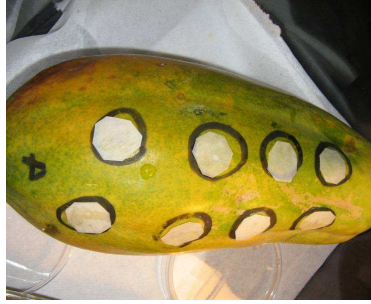
Prueba 1: Fruto de papaya 96 hrs. después de inoculado, el fruto presenta una consistencia dura.



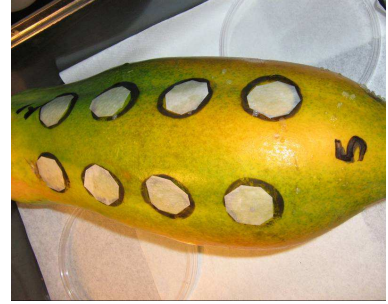
Prueba 2: Fruto de papaya 96 hrs. después de inoculado, el fruto tiene apariencia sana.



Prueba 3: No se ve presencia de ataque de *Colletotrichum* ni de algún otro tipo de patógeno. Se espera que este fruto no sea infectado con *Colletotrichum* dando como resultado una efectiva protección cruzada.



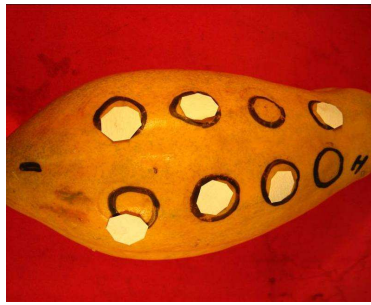
Prueba 4: No se ve presencia de ataque de *Colletotrichum* ni de algún otro tipo de patógeno. Se espera que este fruto no sea infectado con *Colletotrichum* dando como resultado una efectiva protección cruzada. aunque podemos observar una herida a un costado del fruto por lo que tendrá en observación ya que posiblemente esta herida sea ayuda idónea para que penetre *Colletotrichum*.



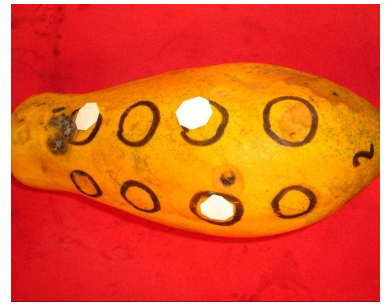
Prueba 5: No se ve presencia de ataque de *Colletotrichum* ni de algún otro tipo de patógeno. Se espera que este fruto no sea infectado con *Colletotrichum* dando como resultado una efectiva protección cruzada.



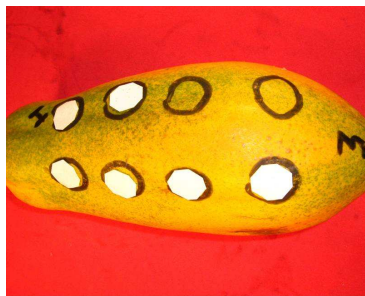
Prueba 6: El fruto se ve sano aparentemente, siendo este inoculado con agua no se esperaría ver aparición de *Colletotrichum*.



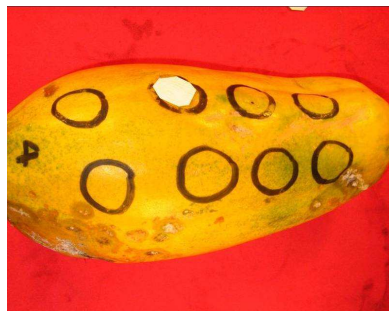
Prueba 1: 120 hrs. después de inoculado el fruto tiene apariencia firme, no se ven daños ocasionados por *Colletotrichum*, no tiene mal olor ni algún otro signo y síntoma de otros patógenos, al parecer hay una efectiva protección cruzada.



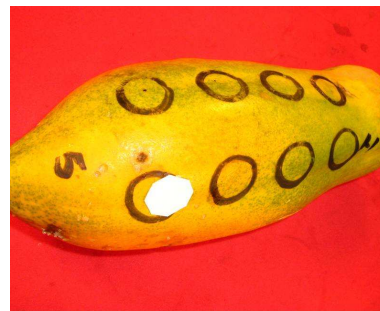
Prueba 2: 120 hrs. después de inoculado, el fruto presenta lesiones ocasionadas por *Colletotrichum* ya que presenta hundimiento en el fruto que es característico de *Colletotrichum* en frutos de papaya, estas lesiones se ven muy avanzadas, y son de color negro, posiblemente este creciendo algún tipo de contaminante en él.



Prueba 3: 120 hrs. después de inoculado el fruto tiene apariencia firme, no se ven daños ocasionados por *Colletotrichum*, no tiene mal olor ni algún otro signo y síntoma de otros patógenos, al parecer hay una efectiva protección cruzada.



Prueba 4: En este caso el fruto se ve severamente infectado por *Colletotrichum*, pero hay que tomar en cuenta que el hongo se está manifestando en áreas lejanas a las de inóculo, las áreas de inóculo son los círculos, en las cuales no se ve aparición del hongo ya que solamente en estas áreas se está dando la protección cruzada. Posiblemente se derramó la gota de suspensión de *Colletotrichum* y afectó esa área desprotegida.



Prueba 5: 120 hrs. después de inoculado el fruto tiene apariencia firme, no se ven daños ocasionados por *Colletotrichum*, no tiene mal olor ni algún otro signo y síntoma de otros patógenos, al parecer hay una efectiva protección cruzada.

2.10.a.b Diagnóstico molecular

La amplificación del ADN se evidenció en el Gel de Agarosa 0.8% teñido con Bromuro de Etidio. Como se puede observar en la siguiente figura. El resultado obtenido con este diagnóstico, fue muy eficiente, ya que se logró confirmar que las cepas utilizadas para las diferentes pruebas antes vistas, son de *C. gloesporioides*. Las diferentes intensidades que presenta cada banda se debió a las diferentes concentraciones de ADN de cada muestra, ya que a pesar de que se colocó la misma cantidad, la concentración no fue igual.

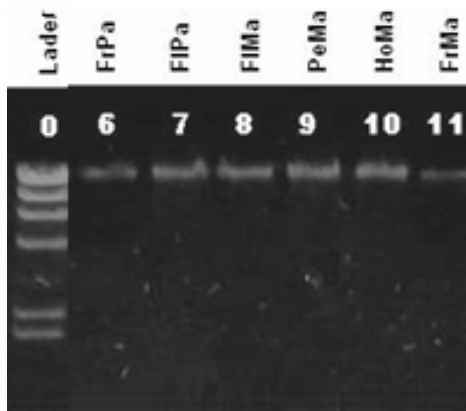


Figura 59 Fotografía de bandas, gel de agarosa con bandas amplificadas de cepas de mango y papaya.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología ECOSUR, Tapachula, México, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2008

El producto de PCR se purificó de acuerdo al protocolo del QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN® y se ajustó a una concentración de 50ng/μl con un volumen de 15 μl. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar en Macrogen (Corea del Sur).

Además de las cepas obtenidas en mango y papaya, se trabajaron con dos secuencias de *Colletotrichum gloeosporioides* amplificadas en la región 5.8S bajadas de la página de internet del Banco Mundial de genes, (www.ncbi.com), para comparar con las cepas trabajadas en laboratorio y un grupo externo para diferenciarlas. Las secuencias bajadas de la página del banco de genes son: Cglo3, Cglo04, Mpyri, Cdes01, Csubl; podemos observar que las secuencias Cglo03 y Cglo04, se agrupan dentro del mismo grupo que las secuencias de las cepas trabajadas en laboratorio: (9FIMn= Flor de Mango; 10PMn= Pedúnculo de Mango; CAHMn1= Hoja de Mango; 7FrPa= Fruto de Papaya= CAFrMn= Fruto de Mango; CAFIPa= Flor de papaya y CAFIAgC3= Flor de Aguacate), por lo cual se determinó que las cepas obtenidas de los cultivos de mango y papaya, están dentro del grupo de *Colletotrichum gloeosporioides*, tal como se ve en el árbol filogenético siguiente, construido con las secuencias obtenidas (Fig. 60).

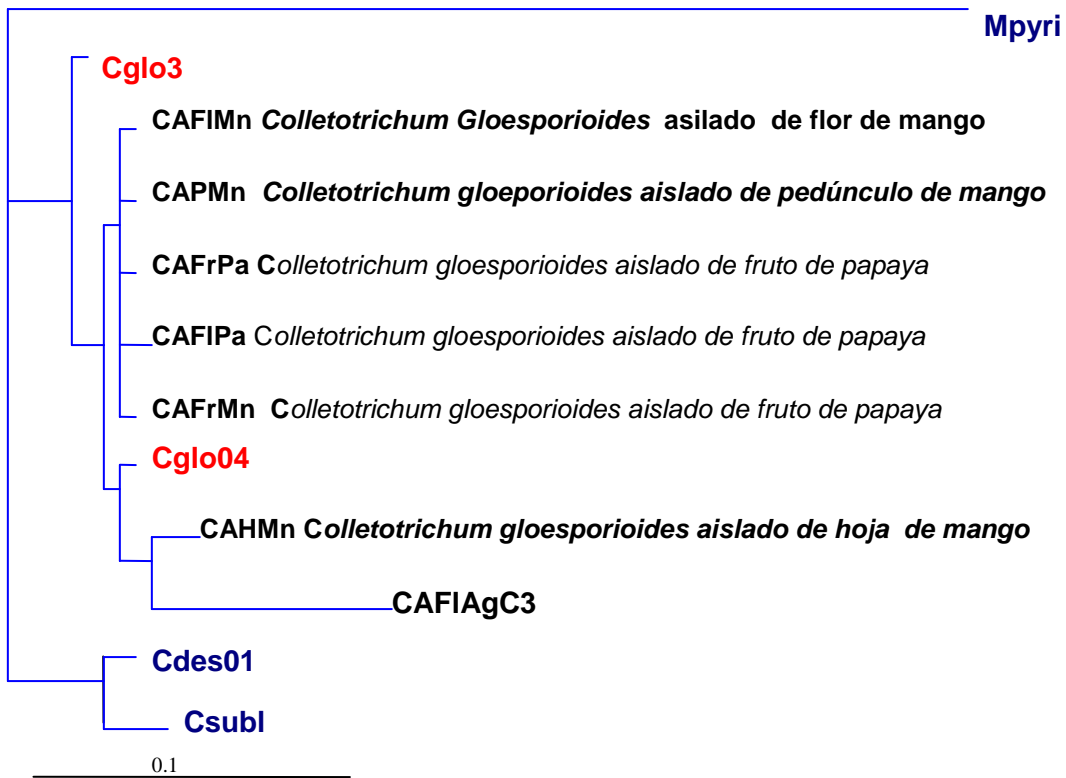


Figura 60 Árbol Filogenético de las cepas de *Colletotrichum* sp.

Fuente: Análisis de secuenciación, por Ariel Oswaldo Reyes Donis, ECOSUR, Tapachula, México, 2008

El árbol filogenético nos muestra qué tan similares son entre sí las cepas asiladas, colocándolos en grupos dependiendo su similitud. Vemos como las cepas de mango y papaya están ubicadas en el mismo grupo el cual es perteneciente a *Colletotrichum gloesporioides*.

2.11 Discusión general

El principal agente causal de la antracnosis en mango y papaya es *Colletotrichum gloesporioides*. Este hongo fitopatógeno puede manifestarse de diferentes formas, dependiendo de los hospederos en el que se encuentre y las condiciones ambientales en que éste se desarrolle. Las diferencias que se pudieron observar a nivel de campo como de laboratorio, en el transcurso de esta investigación son coloraciones y formas de crecimiento de colonias variadas. En papaya las cepas son de color blanco y desarrollo rápido, presentando estructuras reproductivas como acérvulos y conidiosomas en poco tiempo. Para el cultivo de mango la coloración de las cepas son verde musgo a negro con anillos concéntricos diferenciados y el desarrollo del micelio es menos denso que en papaya.

Colletotrichum gloesporioides, es un hongo fitopatógeno de mucha importancia ya que causa daños de gran magnitud en los cultivos de mango y papaya, éste esta presente en las hojas, flores y frutos de dichos cultivos, localizados en las instalaciones del ICTA-Cuyuta, presentando una sintomatología muy particular que consiste en manchas que toman formas de circulares y hundimientos hasta la parte central de dichas manchas.

El almacenamiento, los daños mecánicos, las temperaturas extremas y la anoxia pueden afectar fuertemente al hospedero, por lo tanto las respuestas de defensa pueden inhibirse ante la presencia del patógeno, por lo que la interacción se vuelve compatible, el hospedero es colonizado y posteriormente se enferma. Es por eso que se tomó muy en cuenta que los frutos utilizados para las diferentes pruebas presentaban un poco mas del 50% de madurez por lo que su vida de anaquel y prueba se redujo, pero aun así nos permitió observar la manera en que el hongo ataca y destruye los frutos.

Por esta razón, es necesario profundizar el conocimiento de la patogenicidad; ya que nos permite discriminar entre cepas y lograr así más elementos para el control de la enfermedad. La infección de algunas especies de *C. gloesporioides* parece estar restringida a familias, géneros, o especies vegetales. Sin embargo, aún cuando en esta

investigación se observó que las cepas aisladas a partir de mango y papaya, mostraron una mayor patogenicidad hacia su hospedero de origen, estas no pudieron infectar a su hospedero alterno.

Las cepas de *C.gloesporioides*. al no expresar su patogenicidad en el hospedero alterno evaluado, dio como resultado una infección cruzada negativa, esta nos indica o nos muestra que cepas de *C. gloesporioides* aisladas de mango, no son capaces de infectar frutos de papaya así mismo y de manera cruzada cepas de *C. gloesporioides* aislado de papaya, no son capaces de infectar frutos de mango. Este indicio nos abrió la posibilidad de la realización de las pruebas de protección cruzada como alternativa de manejo poscosecha. Se pudo inducir la protección cruzada tanto en frutos de mango como de papaya; deducimos que estas al estar compitiendo en un mismo hospedero vuelven a este hipersensible a estas, posiblemente por que indujeron a los frutos a producir sustancia fenólicas que indujeran resistencia del fruto hacia este patógeno de manera cruzada. Este fenómeno se logró inducir al inocular en el caso de mango, la cepa aislada de papaya 72 horas antes de inocular la cepa aislada de mango; En frutos de mango la cepa de papaya, al no poder infectar el fruto de mango se convierte en una cepa poco virulenta, pero causando una reacción en el fruto de mango que no permite a al cepa de mango desarrollar su proceso de infección.

Habría que hacer un trabajo de fisiología del parasitismo, para seguir dilucidando las razones de la existencia del fenómeno de protección cruzada con las cepas aisladas de mango y papaya y evaluar a nivel de campo para ver si es posible establecer una alternativa poscosecha para el mercado nacional.

2.12 Conclusiones

- *C. gloeoporioides* presentó variabilidad morfométrica entre cepas aisladas de mango y papaya, en términos de formación de colonias y dimensiones de las esporas.
- Basados en las pruebas de patogenicidad se pudo constatar que las cepas de *Colletotrichum gloesporioides* de mango y papaya, son agentes infecciosos agresivos al estar en su hospedero específico.
- No existe el fenómeno de infección cruzada entre las cepas aisladas de mango y papaya, las cepas de mango no infectan papaya, y las cepas de papaya no infectan mango.
- Existe el fenómeno de protección cruzada, entre cepas aisladas de mango y papaya tanto en frutos mango como en frutos de papaya, por lo tanto es posible dar seguimiento al programa de protección cruzada para la antracnosis de mango y papaya en el ámbito nacional.
- Mediante el diagnóstico molecular, se constató que las cepas obtenidas de los cultivos de mango y papaya, son en verdad de *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz & Sacc.

2.11 Recomendaciones

- Ampliar este estudio a todos los cultivos frutales y otras plantas sospechosas de ser afectadas por *Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz & Sacc.
- Dar seguimiento a las pruebas de protección cruzada con el propósito de validar un método alternativo de protección poscosecha para el mercado nacional.

2.12 Bibliografía

1. Agrios, GN. 1995. Fitopatología. 2ed. México. Noriega. 838p
2. Agrios, GN. 2005. Plant pathology. 5 ed. New York, US, Academic Press. 922 p
3. Aramburu, J *et al.* 2005. Control biológico de las enfermedades de las plantas causadas por virus, fitoplasmas y de otras enfermedades transmisibles. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Consultado 12 sep 2007. Disponible: <http://www.agroinformacion.com/leer-articulo.aspx?not=411>
4. Alameda, I. 2005 Distribución vertical y temporal de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*) sobre una siembra comercial de gandul (*Cajanus cajan* L.). Tesis Ing. Agr. Universidad de Mayaguez. Puerto Rico. 95p
5. Agostini, J.P; Timmer, L.W; Mitchell, D.J., 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. US, University of Minnesota. p1337-1382
6. Atkins, S. & Clarck. I. 2004. Fungal Molecular Diagnostic; A mini review Journal of Applied Genetics (24):3-15
7. Arévalo. L. 2006. Caracterización Morfológica, Patológica, de cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., aisladas de Mango (*Mangifera indica* L.) y Papaya (*Carica papaya* L.), en el ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, FAUSAC. 43 p.
8. Bailey, JA; Jeger MJ. 1992. *Colletotrichum* Biología, patología y control. Wallingford, CAB International. 388p.
9. Bentley, JW. Agricultural Anthropologist: Epidemiología. Cochabamba Bolivia. Consultado 15 abr. 2007. Disponible en <http://www.colpos.mx/ifit/entacar/avances/061.htm>

10. Barnett. H.L; unter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4ed. St. Paul Minnesota.US, American Phytopathological Society. 250p
11. Dickman, MB. 2006. *Colletotrichum gloeosporioides* (en línea). Hilo, Hawaii, Universidad de Hawaii, Departamento de la Patología de Planta. Consultado 28 mar 2007. Disponible en www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/type/c_gloeo.htm
12. Freeman, S; Katan, T. 1997. Identification of colletotrihum species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. Israel Phytopathology 87: 516-521.
13. Freeman, S; Horowitz, S; Shanon, A. 2001. Pathogenic and non pathogenic lifes styles in *Colletotrichum* from strawberry and other plants. Phytopathology 81:986-992.
14. Freeman, S; Minz, D; Maymon, M; Zveibil, A., 2001. Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum*. Phytopathology 91:586-592
15. Gonzáles, M; Rodriguez, R; Zavala, M.E; Jacobo, J.L; Hernández. F., Acosta L. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum limdemutianum*, by using difeferential cultivars and molecular markers. México. p 292-299.
16. Huner. JE. 1992. Incidence epidemiology and control of disease of papaya in Hawaii. Thropical Agriculture 49:61-77.
17. Lewin, B., 2004. Genes 8 ed. New York, Us, Pearson prentice Hall. 1027p.
18. Matta, G. 1984. Diagnostico general del parcelamiento Cuyuta, Masagua, Escuintla, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, FAUSAC. 13 p.
19. Monterroso, D. 2005 Caracterización molecular, morfológica y patológica de cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., aisladas mango y papaya y evaluación de protección cruzada como alternativa para manejo poscosecha. Proyecto presentado ante AGROCYT-MAGA, para financiamiento. Guatemala, FAUSAC. 25p

20. Navas. F., 2007. Industria de Mango en Guatemala (en línea). Consultado 10 de Abr 2007 disponible en www.maga.con.gt.
21. Pérez Redondo, AR. 2006. Tecnologías Sostenibles para el manejo de la antracnosis en papaya y mango (en línea). Colombia. Consultado 20 May. 2007. Disponible en http://www.turipana.org.co/manejo_antracnosis.htm
22. Pestano, B. 2001 Grupo de apoyo a las cooperativas independientes de Cuba: El cultivo de la papaya (en línea). Cuba. Consultado 24 de Marzo de 2007 Disponible en <http://www.gacicuba.net/Pestano5.htm>.
23. Profruta. (Proyecto desarrollo de la fruticultura y agroindustria).1999 Manual del cultivo de papaya (*Carica papaya L.*). Guatemala, MAGA. 43p.
24. Rodríguez, M; Guerreros, M; Sandoval, R. 2002. Guía Técnica del cultivo de mango (en línea). El Salvador. Consultado 20 Marzo. 2007. Disponible en <http://72.14.203.104/search?q=cache:3tvVTVnfSzgJ:www.centa.gob.sv/documentos/guias/mango.pdf+guia+tecnica+en+mango&hl=es&gl=gt&ct=clnk&cd=4>.
25. Rodríguez, S; 2006 Estudios Histopatológicos de mancha mantecosa en café y comportamiento de *Colletotrichum* spp. en plantas obtenidas por cultura embrionaria. El Salvador, s.n. 204 p.
26. Timmer, L.W; Agostini, JP; Zitko, JE; Zulfigar, M. 1994. Postbloom fruit drop of citrus, an increasingly prevalent disease of citrus in the America. University of Florida. Phytopathology 78(4): 329-334.
27. White, TJ; Bruns, TJ; Lee, S; Taylor JW. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR protocols, A guide to methods and amplifications. New York. ed M.A.D.H Gelfan. 450p
28. Yuan, J; Reed, A; Chen, F; Stewart, CN. 2006., statistical analysis of realtime PCR data BCM Bioinformatics. US University of Tennessee. p 234-236.

29. Zulfigar, M; Brlansky; R. H. And Timmer, L. W., 1996. Infections of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloesporioides*. Canadá, University of Guelph. p 121-128.

30. Zolan, ME; Pukkila, PJ. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and cellular Biology* 6:195-200.

2.13 Anexos

Anexo 1 Cultivo de papaya(*Carica papaya* L.)

Cultivo de Papaya (*Carica papaya* L.)

Origen

El cultivo de papaya es originario de la América tropical.

Descripción

Familia: Caricaceae.

Genero: Carica.

Especie: Carica Papaya

Es una planta arbustiva cuyo tallo es hueco, alcanza alturas de 8 a 10 metros según la edad, rara vez ramifica. Esta especie es considerada polígama y presenta plantas con flores femeninas, masculinas y hermafroditas.



Figura 61. Cultivo de papaya

Fuente: fotografía tomada en campo en el ICTA-CISUR, por Ariel Oswaldo Reyes Donis. 2007

Plagas y Enfermedades

Las plagas inciden negativamente en la producción de la papaya, ocasionando daños a los tallos, hojas y frutos y en ocasiones transmiten enfermedades severas que pueden destruir las plantaciones (22).

Entre las enfermedades de mayor importancia económica, están las siguientes:

Nombre	Agente causal
Antracnosis del fruto	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Falsa herrumbre	<i>Puccioniopsis caricae</i>
Mildiu polvoriento	<i>Oidium sp.</i>
Mosaico	Virus

Anexo 2 Cultivo de Mango (*Manguifera indica*)

Cultivo de Mango (*Manguifera indica*)

Origen

Cultivo proveniente del continente asiático, geográficamente ubicado al noreste de la India.

Descripción del cultivo

El mango es un árbol que puede alcanzar los 20 m de altura. El tronco, con un diámetro de hasta 20cm, tiene la corteza de color gris claro o castaño; al principio su superficie es lisa y luego, con la edad, se agrieta. En el género *Manguifera* existen aproximadamente quince especies cuyos frutos son comestibles (21).



Figura 62. Cultivo de mango, fotografía tomada en campo ICTA-CISUR, por Ariel Oswaldo Reyes Donis, 2007

Tipos y Variedades

Algunas variedades introducidas, que muestran una relativa buena adaptación a nuestras condiciones, están siendo cultivadas, especialmente por sus características que las hacen aptas para exportación son: Tommy atkins, Haden, Irwin, Kentt, Ataulfo, entre otras (24).

Plagas y Enfermedades

El mango es una especie poco vulnerable al ataque de plagas y enfermedades, aunque en ocasiones lo afecta la mosca de la fruta y las cochinillas (o escamas). En las enfermedades, las principales que pueden afectar al mango son el oidio y la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (1).

C. gloeosporioides produce una lesión muy distinta en el mango, pero el hongo requiere la confirmación de su presencia por aislamiento en el laboratorio. Los resultados tienen que ser interpretados con cuidado, ya que otro hongo *C. acutatum* es una saprofita común y está involucrado en la antracnosis del mango.

Anexo 3 Formulario para secuenciación de cepas de *Colletotrichum*.

Macrogen Service Center

Page 1 of 2

Basic information**Order number:** 080212FN-027**Data of order:** 2008-01-12**Service:** Normal Service**user ID:** Fholguin**name:** Francisco Holguín**code:** PCR/DNA**Order in detail:** Sequencing 26 reaction(s)
preferred sample storage: 1 month(s)**PO number:** RFC: CFS941020BZ5**attention:** El Colegio de la Frontera Sur**Payment method:** credit card**Dispatched by****Macrogen`s Fe** YES**dEx/DHL account:****comment:** We send 13 samples for sequencing, can you give us the primers for the reaction, please?. I want the reactions in two sense**Sample Information**

	sample	type	conc(ng/ul)	number of reaction
1	1HAg	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
2	2FrAg	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
3	3FIAg	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
4	4HAn	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
5	6FrAn	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
6	7FrPa	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
7	8FIPa	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
8	9FIMn	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
9	10PMn	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
10	11HMn	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
11	12FrMn	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
12	14G1	PCR/DNA	Non_cuantificated	2
13	15G2	PCR/DNA	Non_cuantificated	2

Continuación Anexo 3.
Macrogen Service Center

Page 2 of 2

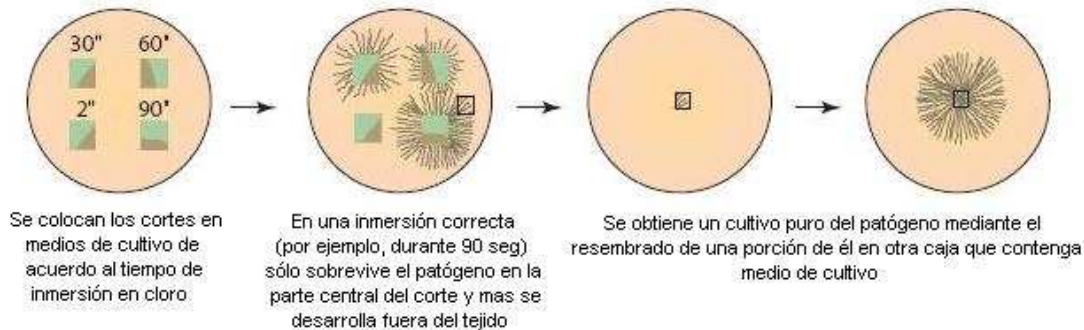
Primer Information

	Primer	type	sequence(5` to 3`)	Concentration (pmol/ul)
1	ITS1	Universal	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	10uM
2	ITS4	Universal	TCCTCCGCTTATTGATATGC	10uM

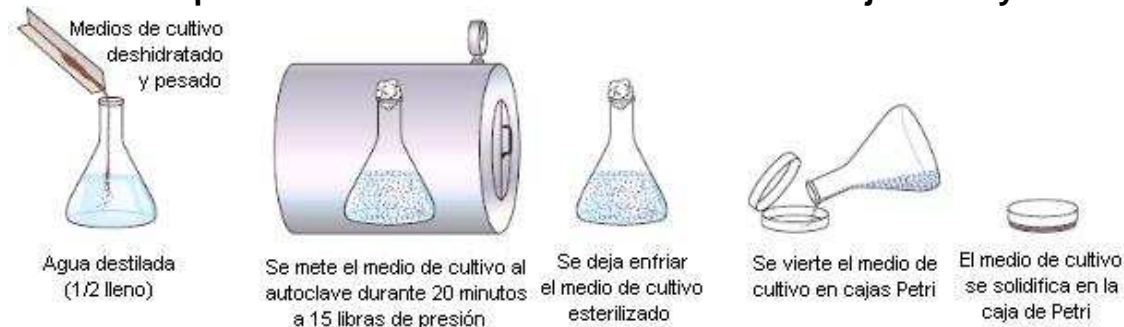
Reaction Information

	sample	primer
1	1HAg	ITS1
2	2FrAg	ITS1
3	3FlAg	ITS1
4	4HAn	ITS1
5	6FrAn	ITS1
6	7FrPa	ITS1
7	8FlPa	ITS1
8	9FlMn	ITS1
9	10PMn	ITS1
10	11HMn	ITS1
11	12FrMn	ITS1
12	14G1	ITS1
13	15G2	ITS1
14	1HAg	ITS4
15	2FrAg	ITS4
16	3FlAg	ITS4
17	4HAn	ITS4
18	6FrAn	ITS4
19	7FrPa	ITS4
20	8FlPa	ITS4
21	9FlMn	ITS4
22	10PMn	ITS4
23	11HMn	ITS4
24	12FrMn	ITS4
25	14G1	ITS4
26	15G2	ITS4

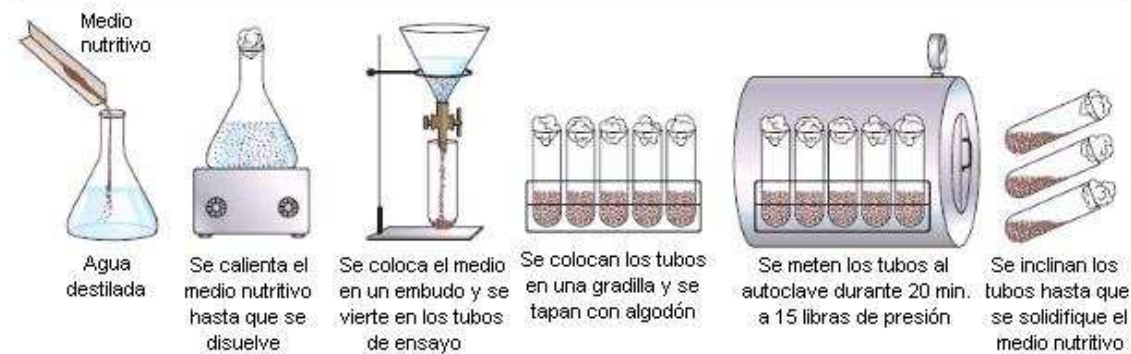
Anexo 4 Aislamiento de hongos patógenos del tejido una planta infectada.



Anexo 5 Preparación de medios de cultivo sólidos en cajas Petri y tubos de ensayo

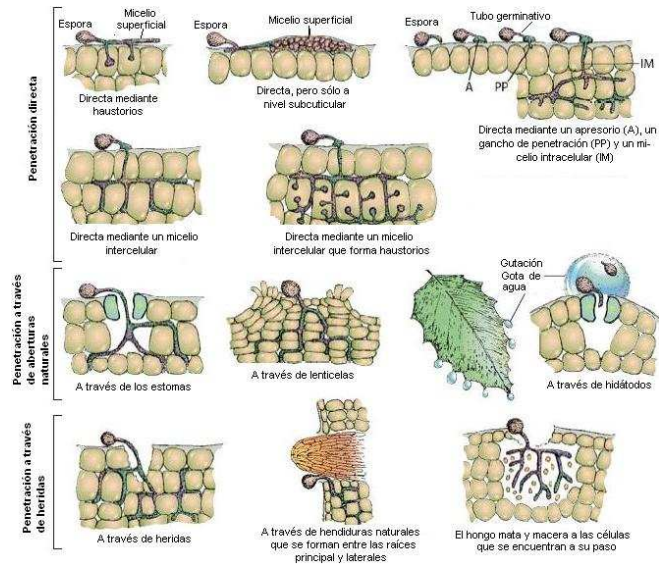


Preparación de medios de cultivo sólidos en cajas Petri



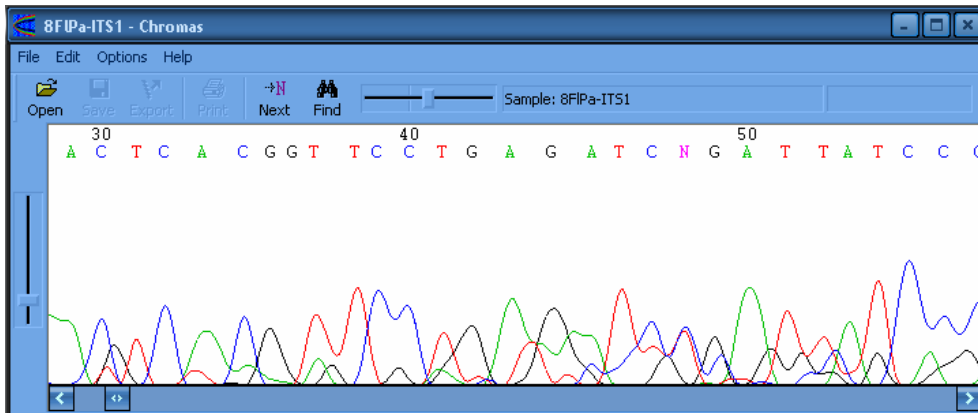
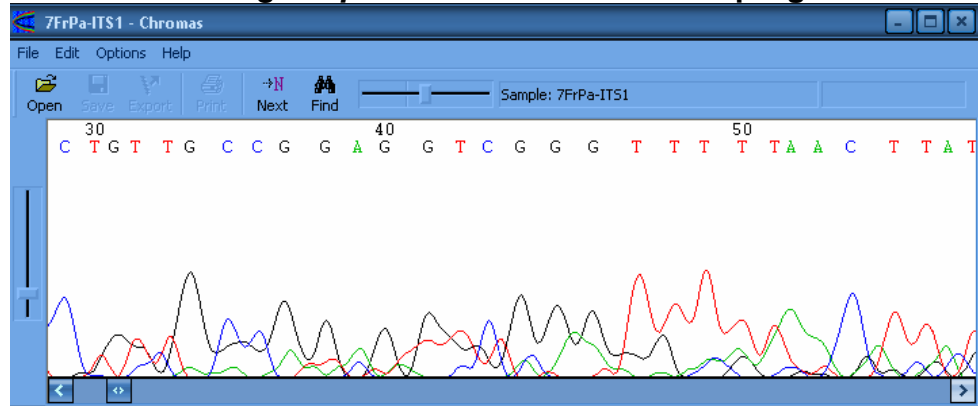
Preparación de medios de cultivo sólidos en tubos de ensayo inclinados

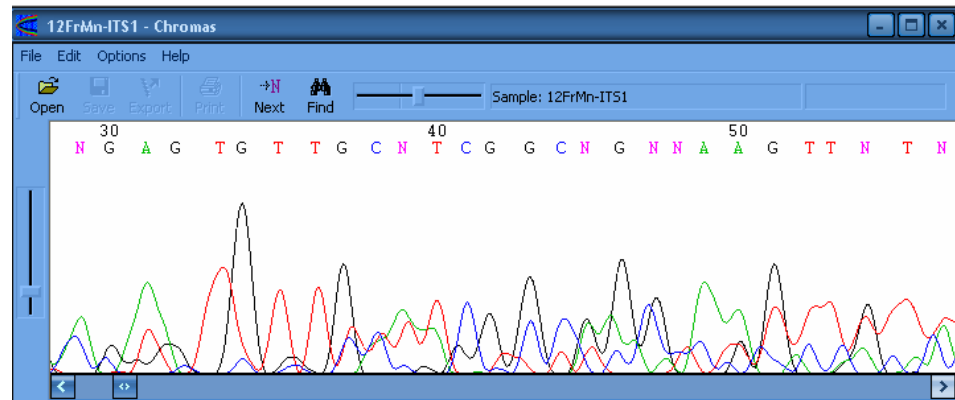
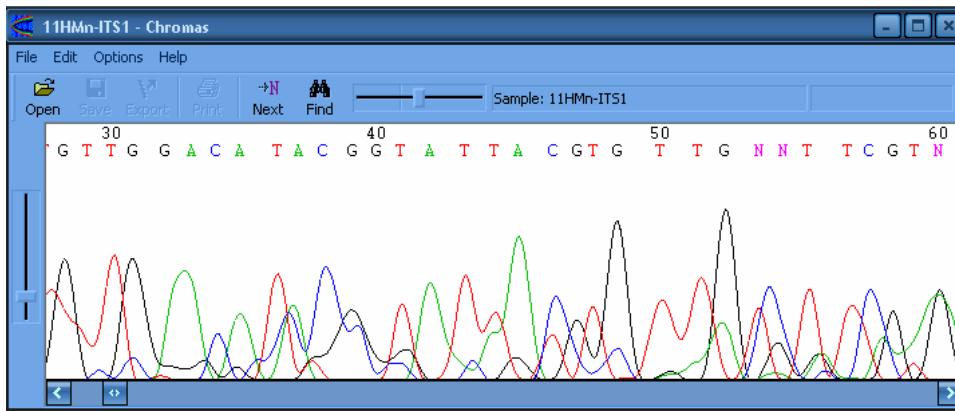
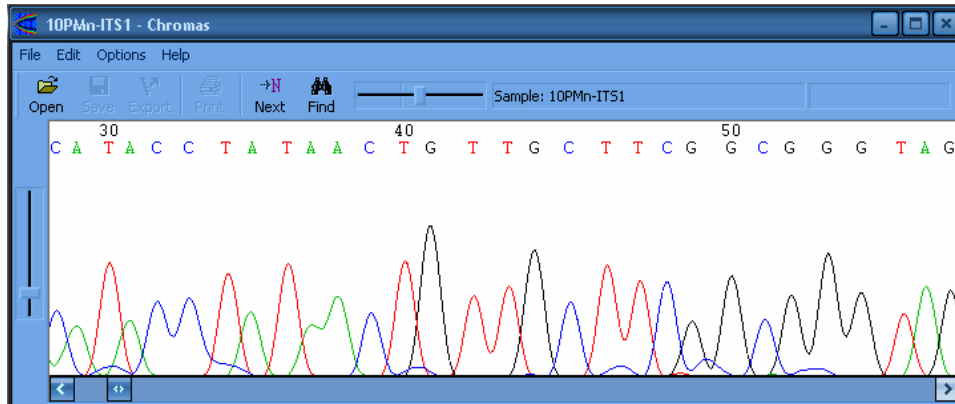
Anexo 6 Métodos de penetración e invasión por hongos



Fuente: Agrios, G.N., 2005

Anexo 7 Secuencias de *C. gloesporioides* obtenidas en el programa Chromas





Anexo 8

Glosario de términos fitopatológicos

Acervulo: Cuerpo fructífero asexual, subepidérmico y en forma de plato, que produce conidióforos cortos y conidios.

Agar: sustancia de consistencia gelatinosa que se obtiene de algas marinas y que se utiliza para preparar medios de cultivo sólidos, con el objeto de estudiar y cultivar los microorganismos.

Aislamiento: separación de un patógeno de su hospedante y su cultivo en un medio nutritivo.

Antracnosis: Tipo de mancha sobre hojas o frutos, generalmente negras y deprimidas, ocasionada por hongos que producen sus esporas asexuales en una acérvula.

Clorosis: Amarillamiento de los tejidos normalmente verdes, debido a la destrucción de la clorofila o a la imposibilidad de sintetizarla.

Codificación: Proceso por el cual la secuencia de nucleótidos de una cierta porción del ARN, determina la secuencia de aminoácidos durante la síntesis de una proteína en especial.

Conidio: Espora asexual de un hongo formada en el extremo de un conidióforo.

Cultivo: Crecimiento artificial de microorganismos en un medio de nutritivo preparado; colonia de microorganismos mantenidos artificialmente en dicho medio de nutritivo.

Desinfectante: Agente físico o químico que impide la infección de una planta, órgano o tejido.

Espora: unidades reproductivas de los hongos, constituida por una o varias células.

Estado imperfecto: Parte del ciclo de vida de un hongo en el cual no se producen esporas sexuales.

Estado perfecto: Fase sexual en el ciclo biológico de un hongo.

Fitoalexina: Sustancia que producen los tejidos del hospedante para inhibir el desarrollo de hongos parásitos y que se forman cuando las células de la planta hospedante entra en contacto con el patógeno.

Fitopatógeno: Término que se aplica a los microorganismos que producen enfermedades en las plantas.

Fitotóxico: Que es tóxico para las plantas.

Funguicida: Compuesto tóxico para los hongos.
la formación de yemas a partir del organismo original.

Gen: Porción lineal del cromosoma que determina o condiciona uno o más caracteres hereditarios. . La unidad funcional más pequeña del material genético.

Genotipo: Constitución genética de un organismo.

Hospedante: Planta invadida por un parásito y de la cual éste obtiene sus nutrientes.

Infección: Establecimiento de un parásito dentro de una planta hospedante.

Inoculación: Llegada o transferencia de un patógeno a su hospedante.

Inocular: Acción que pone en contacto un patógeno con una planta hospedante o un órgano de ella.

Inoculo: Patógeno o partes de él que ocasiona enfermedad.

Lesión: Área o región definida de la planta, caracterizada por un cambio morfofisiológico en la misma.

Mancha: Lesión definida, por lo común clorótica o necrótica, que difiere en color de los tejidos circundantes.

Mancha foliar: Lesión limitada sobre la hoja.

Marchites: Pérdida de rigidez y caída de los órganos de la planta que por lo general se debe a la falta de agua en su estructura.

Medio de cultivo: Medio nutritivo preparado para el cultivo de microorganismos.

Micelio: Hifa o masas de hifas que constituyen el cuerpo de un hongo.

Micosis: Nombre de las enfermedades producidas por hongos.

Momificado: Fruto seco y rugoso.

Necrótico: Muerto y decolorado.

Patogenicidad: Capacidad relativa que tiene un patógeno para producir enfermedad.

Patógeno: Entidad que produce enfermedad.

Penetración: Invasión inicial de un hospedero por un patógeno.

Período de incubación: Período comprendido entre la penetración de un patógeno en su hospedante y la manifestación de los primeros síntomas de la enfermedad.

Pudrición: Ablandamiento, decoloración acompañado a veces por desintegración de los tejidos de una planta por una infección fúngica o bacteriana.

Purificación: Separación de las partículas virales en forma pura de los componentes celulares.

Variabilidad: Capacidad que tienen los organismos para cambiar sus características de generación en generación.

Virulencia: Grado de patogenicidad de un agente parásito determinado.



CAPITULO III

SERVICIOS

Servicios realizados en el centro de Innovación Tecnológica del Sur, del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla

3.1 Presentación

El Programa de Frutales Tropicales del Centro de Innovación Tecnológica del Sur del ICTA (ICTA-CISUR) se desarrolla en la aldea de Cuyuta, municipio de Masagua, departamento de Escuintla, en este parcelamiento se encuentra ubicado el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas ICTA-CUYUTA, cuenta con un área exclusiva a la investigación de mas de 30 especies de frutales que abarca un área de aproximadamente de 5 manzanas, en el cual se realizó el Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía (EPSA), realizando diferentes actividades agrícolas y de investigación.

El área de frutales cuenta con una diversidad de especies que aún no han sido rotulados o identificados, tales como: aguacate, anona, guayaba, mango, papaya, carambola, etc. Siendo este uno de los más importantes en el área de investigación y promoción, tomando este problema como una oportunidad de servicio para la identificación con el nombre común, el nombre científico y a la familia a la que pertenece cada especie de los árboles frutales del parcelamiento.

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas es una entidad del Estado que se encarga de brindar información técnica a la persona que desea solicitarla, y de ahí surge el servicio de grabar un disco compacto (DC) interactivo, el cual contiene la información técnica de las diferentes especies de frutales ubicadas en el parcelamiento. El CD interactivo contiene información como la clasificación taxonómica, requerimientos edafo-climáticos, manejo de plagas y enfermedades, entre otros temas de interés.

El tercer servicio consistió en la elaboración de un cepario de (*Colletotrichum gloeosporioides*) aislados en Anona, Aguacate, Carambola, Papaya, Mango y Guayaba, con la finalidad de colaborar con la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en la conservación de material fitopatógeno.

3.2 Objetivos

GENERAL

- Contribuir a la solución de la problemática de la estación ICTA-CUYUTA y el laboratorio de fitopatología de la FAUSAC a través de la ejecución de servicios de utilidad para ambas entidades.

ESPECIFICOS

- Identificar mediante el uso de rótulos las diferentes especies frutícolas que se encuentran en la estación de frutales ICTA-CUYUTA.
- Grabar un disco compacto (DC) interactivo con información de los diferentes árboles frutales, indicando cada una de las especies, añadiendo información técnica y fotográfica para cada una.
- Elaborar un cepario para el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, a través de nuevas técnicas que permitan mejorar la conservación del patógeno y a su vez ahorrar espacio físico.

3.3 Servicio I

Rotulación de especies frutícolas

Objetivo

- Rotular las 27 especies de árboles frutales del ICTA-Cuyuta, Masagua, Escuintla. Con el propósito de identificarlas para facilitar su estudio.

3.3.a Metodología

Para este servicio se realizó un recorrido por el área de frutales con la ayuda del Ing. Otoniel Sierra, para la identificación y reconocimiento de las diferentes especies frutícolas presentes en el área.

3.3.b Adquisición de los materiales

Dentro de los materiales que se adquirieron están: Una lámina de metal de 4X6 pies, una tijera china, brochas de diferentes tamaños, soportes de madera, tachuelas de 1 pulgada, pinturas de color blanco, azul, rojo y negro, molde de letras

3.3.c Corte de rótulos

De la lámina de metal se realizaron cortes de pequeños rótulos de 30X30 centímetros,

3.3.d Unión de rótulos y soporte

Los rótulos se unieron a los soportes de madera mediante las tachuelas de una pulgada de largo.

3.3.e Pintado de rótulos

Los rótulos fueron pintados de color blanco de fondo y las letras fueron de color negro y rojo.

3.3.f Elaboración de rótulos

Los rótulos fueron elaborados con el nombre común en la primera fila, nombre científico en la segunda fila y la siguiente a la familia a la que pertenece.

3.3.g Colocación de rótulos

Los rótulos fueron colocados en el campo a la par de cada frutal representativo del lugar.

3.4 Resultados

Los rótulos tienen la información siguiente: nombre común, el nombre técnico o científico. Las letras van a ser de color azul atlántico y el fondo de color blanco.

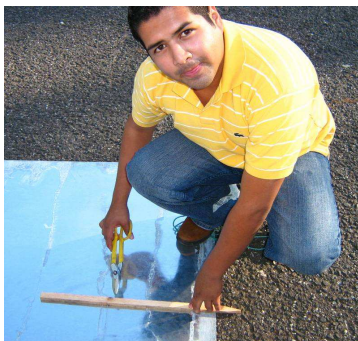


Figura 61. Elaboración de rótulos.



Figura 62. Rotulación de árboles frutales.

Se identificaron 27 especies frutícolas en toda el área de frutales entre las cuales podemos mencionar: aguacate, anona, carambola, guayaba, mango, papaya, noni, palmito, mazapán, mamey, manzana de agua, nance, toronja, jocote marañón, pejibaye, entre otras.

3.5 Conclusiones

Se rotularon las 27 especies de árboles frutales ubicados en el programa de frutales tropicales, en el ICTA-Cuyuta, contribuyendo de esta manera, al fácil reconocimiento de estas especies.

3.6 Servicio 2

Elaboración de CD interactivo

Objetivo

- Contribuir a la biblioteca de la estación del ICTA-cuyuta, brindando información importante de los diferentes cultivos frutales ubicados en el programa de frutas tropicales.

3.7.a Metodología

Para la elaboración de este servicio, se realizó la medición de la finca con la ayuda de un GPS, tomando datos de la ubicación de cada especie frutícola y del perímetro del área de frutales.

3.7.b Adquisición de los materiales

Los materiales empleados para este servicio, podemos mencionar: GPS Etrex, libreta de campo, cámara digital, información técnica de cada cultivo, power point, CD.

3.7.c Procesamiento de datos

Para la obtención del mapa o croquis del área de frutales se procedió a bajar las coordenadas UTM del GPS al ordenador utilizando el programa Arcview para graficarlo.

3.7.d Elaboración del CD

Una vez elaborado el mapa se procedió a elaborar el CD interactivo en el programa Microsoft Power Point, haciendo hipervínculos sobre cada especie frutícola en el mapa con su respectiva información técnica.

3.7.e Resultados

La grabación de este disco compacto, es de gran ayuda a la biblioteca de la estación del ICTA-cuyuta, ya que los registros con los se que cuentan sobre diferentes especies de árboles frutales, no estan en muy buen estado, así mismo no se cuenta con información de todas las especies frutales que se encuentran ubicadas en el proyecto de frutales tropicales.



Figura 63. Presentación CD interactivo.

PAPAYA

TAXONOMÍA
Familia: Caricáceas
Orden: Fanales
Especie: *Carpica papaya*
Origen: América Central (Sur de México). Actualmente se cultiva en Florida, Hawái, África Oriental, Británica, Sudáfrica, Ceilán, India, Islas Canarias, Archipiélago Malayo y Australia.

Planta: Hierba arborescente de crecimiento rápido, de corta vida, de tallo seniloso o algunas veces ramificado, de 2-30 m de altura, con el tronco recto, cilíndrico, suave, esponjoso-fibroso suelto, jugoso, hueco, de color gris o café grisáceo, de 10-30 cm de diámetro y endurecido por la presencia de cicatrices grandes y prominentes causadas por la caída de hojas e inflorescencias.

Sistema radicular: Muy superficial, lo que condiciona el laboreo del terreno.

Hojas: Alternas, aglomeradas en el ápice del tronco y ramas, de pecíolo largo; ampliamente patentes, de 25-75 cm de diámetro, lisas, más o menos profundamente palmadas con venas medias robustas, irradiantes; la base es profundamente cordada con lóbulos sobrepuestos; hay 7-13 lóbulos grandes, cada uno con la base ancha o un tanto constreñido y acuminado, hacia apical.

Flores: Los arbutos de papayo tienen tres clases de peces diferentes: unos con flores femeninas, otros con flores hermafroditas y otros con flores masculinas.

Las flores femeninas tienen un cáliz formado por una corona o estrella de cinco puntas muy pronunciada y fácil de distinguir. Encima de éste se encuentra el ovario, cubierto por los sépalos; éstos son cinco, de color blanco amarillito, y cuando muy tiernos, ligeramente tocados de violeta en la punta; no están soldados. Los estigmas son cinco, de color amarillito, y tienen forma de

abanico. Los frutos de este pie son grandes y globosos.

Las flores hermafroditas tienen los dos sexos y el árbol que las posee tiene a su vez tres clases de flores diferentes. Una llamada *pentápetala*, parecida a la flor femenina, pero al separar los pétalos se aprecian cinco estambres y el ovario es lobulado. Los frutos de esta flor son globosos y lobulados. Otro tipo de flor es la llamada *elargada* y tiene diez estambres, colocados en dos tandas; la flor es alargada y de forma cilíndrica, al igual que el ovario, dando frutos alargados. El último tipo de flor es la *intermedia o irregular*, no es una flor bien constituida, formando frutos deformes.

Las flores masculinas crecen en largos pedúnculos de más de medio metro de longitud y en cuyos extremos se encuentran racimos constituidos por 15-20 florecillas. Las flores están formadas por un largo tubo constituido por los pétalos soldados, en cuyo interior se encuentran 10 estambres, colocados en dos tandas de a cinco cada una. La flor tiene un pequeño pistilo rudimentario y carece de estigmas. Estas flores no dan frutos, pero si lo hacen son alargados y de poca calidad.

Frutos: Baya ovoide-oblonga, sistostoma o casi cilíndrica, grande, carnosos, jugosa, raturada longitudinalmente en su parte superior, de color verde amarillento, amarillo o anaranjado cuando madura, de una celda, de color anaranjado o rojo por dentro con numerosas semillas parietales y de 10-25 cm o más de largo y 7-15 cm o más de diámetro. Las semillas son de color negro, redondeadas u ovoides y encerradas en un anillo transparente, gelatinoso; los cotiledones son ovoides-oblongos, aplanados y de color blanco.



SIGUIENTE
ANTERIOR
MENU PRINCIPAL

Figura 64. Contenido CD interactivo, cultivo de papaya.

ZAPOTE

Zapote:		
<p>Nombre técnico: Pouteria sapota (Jacq.) H.E Moore & Stearn</p> <p>Nombres comunes: Zapote Colorado, Mamey Colorado, Mamey de Tierra, Mamey Roto, Yuco. Zapote (El Salvador), Zapote Mamey (México), Zapote Domingo (República Dominicana).</p> <p>Origen y distribución: Es originario de América Central y del Sur de México, se siembra como sombra en plantaciones de café o como árbol de patio. Se cultiva en Costa Rica, Cuba, Puerto Rico, República Dominicana, Guatemala, México y Florida.</p> <p>Varietades: Costa Rica, Cuba, Puerto Rico, República Dominicana y Florida han seleccionado en los últimos 30 años, clones que se están propagando vegetativamente. En El Salvador se conocen los tipos: 'Nagafaj', 'Rivera', 'Cáceres', 'Valente', 'Velado', 'Tazumal' y en Florida 'La Cubana I', de muy buena calidad.</p> <p>Rendimiento: 250 a 400 frutos por árbol. De 12,500 a 25,000 frutos por hectárea, dependiendo del distanciamiento de siembra y a partir de los 5 años de edad de la planta. El peso del fruto oscila entre 1.5 y 2.5 kgs. =</p>	<p>Época de producción: La floración se da entre enero y marzo y produce de abril a julio y hasta agosto, dependiendo de la disponibilidad de humedad en el suelo, del programa de fertilización, la variedad y el clima. Árboles a partir de semilla producen a los 7 años, injertados desde 4 años y pueden permanecer produciendo entre y 50 años.</p> <p>Zonas potenciales de producción: Meseta Central, valles intermedios, parte media de la Cordillera Norte y Cadena Costera de El Salvador.</p> <p>Propagación: Se reproduce por semillas y por injerto. Para obtener buenos resultados es recomendable escarificar las semillas y colocarlas frescas en un almáximo de arena de río fina y lavada. La germinación ocurre de 12 a 18 días, el crecimiento inicial es rápido, se debe transplantar a bolsas de polietileno antes de cumplir una semana de germinación para evitar daños en la raíz. Se puede propagar vegetativamente a través de injerto de enchape lateral de varetas no pecioladas sobre patrones de 6 a 8 meses. Se considera que el rendimiento es más alto cuando se defolían las ramillas 12 a 15 días antes de cortar las varetas del árbol o cuando se recolectan 15 a 20 días a 20 días antes</p>	<p>Requerimientos agroclimáticos: Es de clima cálido y húmedo.</p> <p>Suelo: Se adapta a gran variedad de suelos, prospera mejor en aquellos profundos, rícos en materia orgánica, de textura liviana como Francoarenosa y con buen drenaje.</p> <p>pH: Entre 5 a 6.5</p> <p>Precipitación: Superior a los 1,400 mm, distribuidos a lo largo del año.</p> <p>Temperatura: De 22 a 28°C</p> <p>Altitud: De 0 a 1,200 msnm. Topografía: Para todo tipo de pendiente con obras de conservación de suelos, aunque se prefieren desde planos hasta ondulados.</p>



SIGUIENTE
ANTERIOR
MENU PRINCIPAL

Figura 65. Contenido CD interactivo, cultivo de zapote.

3.8 Servicio 3.

Elaboración de Cepario

Objetivo

- Elaborar un cepario para el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, a través de nuevas técnicas que permita mejorar la conservación del patógeno y a su vez ahorrar espacio físico.

3.8.a Metodología

Para el almacenamiento de las cepas de *Colletotrichum* spp., se utilizaron los cultivos monospóricos de las diferentes cepas de *Colletotrichum* spp., provenientes de mango, papaya, anona, aguacate, carambola y guayaba, se tomaron pequeños fragmentos de papel filtro previamente esterilizados, los cuales se fueron colocando sobre el área de avance de la colonia del hongo, luego de colocados los fragmentos de papel, se mantuvieron por un día dentro de la incubadora a una temperatura de 22°C, para que los fragmentos de papel fueran cubiertos con el micelio del hongo, para luego poder pasarlos a viales estériles con agua esterilizada debidamente identificados con el número de cepa y su procedencia, los viales se colocaron en planchas de duroport para que estos estuvieran ubicados de manera adecuada y de fácil transportación.

3.9 Resultados

Se pusieron en conservación cepas de *Colletotrichum spp.* aisladas de papaya, mango, anona, aguacate, carambola y guayaba., haciendo uso de una nueva técnica de conservación en papel filtro estéril y agua, dando al hongo las condiciones adecuadas para que este entre en un periodo de dormancia, y así mismo garantizamos la existencia de material fitopatológico para su previo estudio.



Figura 65. Cepario de *Colletotrichum*

Este es un método efectivo de conservación, ya que luego de pruebas de activación de cepas, las cuales consisten en colocar el material fitopatógeno en medio de cultivo en este caso EMA (extracto de malta agar), se ha podido evidenciar que el hongo aún esta en capacidad de reproducirse y de infectar a las plantas.

3.10 Conclusiones

Se lograron establecer 27 rótulos de frutales con su nombre común, nombre científico y a la familia a que pertenece.

Se elaboró el CD interactivo con su respectivo hipervínculo sobre la información técnica sobre el mapa del área de frutales.

Se lograron aislar 2 cepas de anona, 3 cepas de aguacate, cepas de 3 carambola, 2 cepas de guayaba, 4 cepas de mango y 2 cepas de papaya.

De las 16 cepas asiladas de anona, aguacate, carambola, guayaba, papaya y mango se realizaron 14 copias de cada una.

3.11 Recomendaciones

Es necesario hacer un levantamiento topográfico del área de frutales en el ICTA-cuyuta, con teodolito u otro aparato de medición mas sofisticado, ya que el utilizado para medir el área cuenta con margen de error de 5 metros por punto tomado.

3.12 Anexos

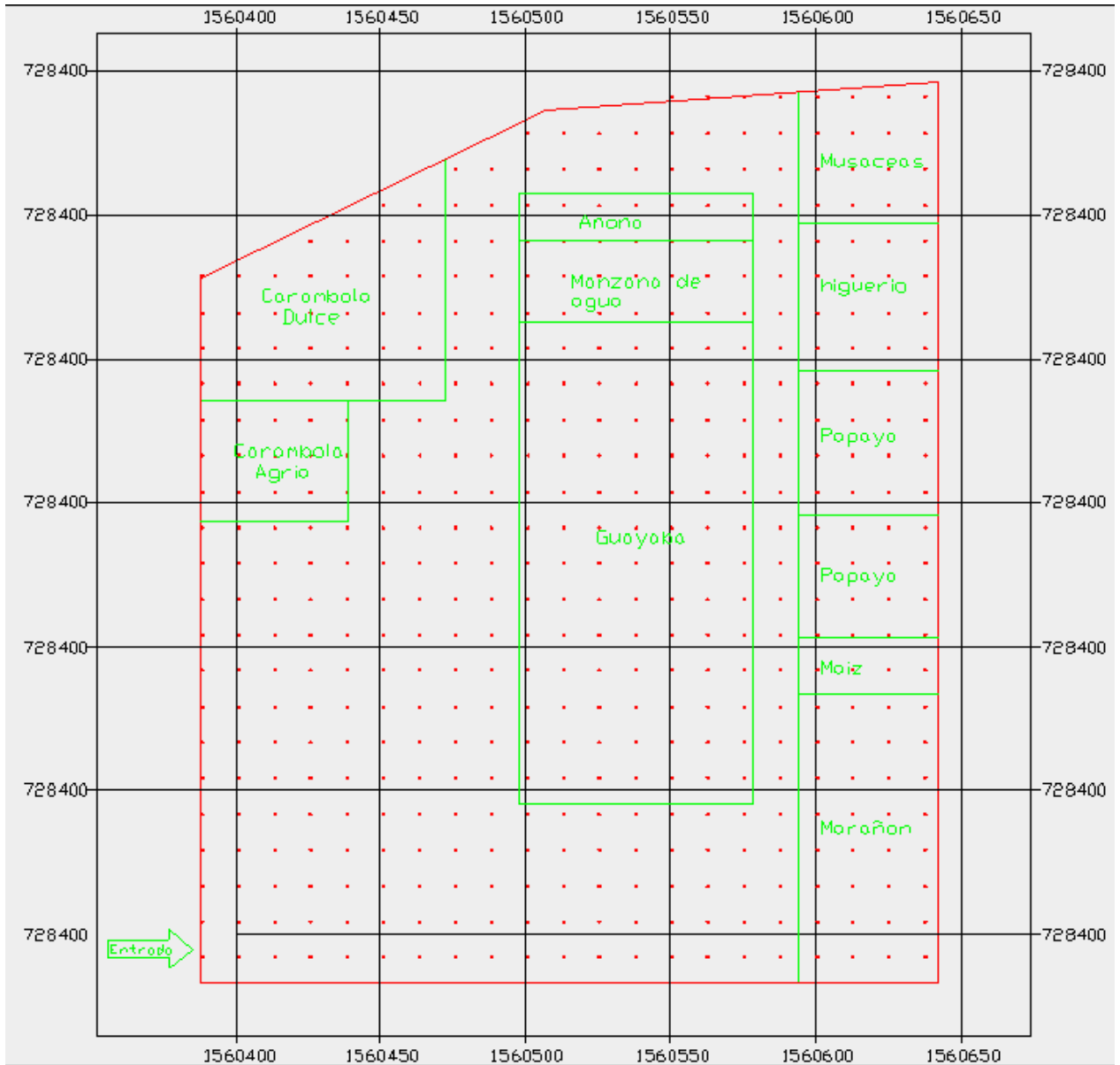


Figura 66. Mapa del área de frutales con coordenadas UTM.