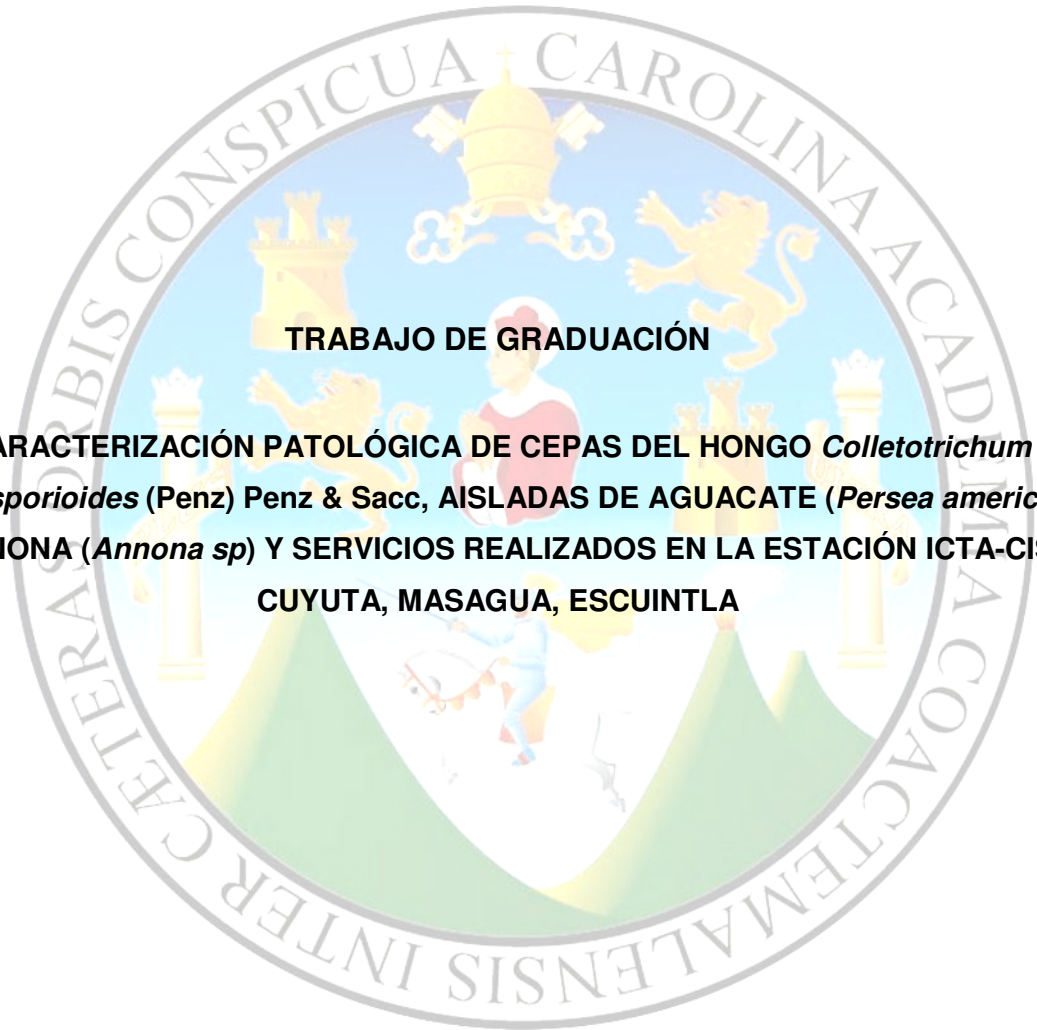


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA**



TRABAJO DE GRADUACIÓN

CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA DE CEPAS DEL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, AISLADAS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill), ANONA (*Annona sp*) Y SERVICIOS REALIZADOS EN LA ESTACIÓN ICTA-CISUR-CUYUTA, MASAGUA, ESCUINTLA

ANTONIO FORTUNATO HERNÁNDEZ LÓPEZ

GUATEMALA, julio de 2009

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA

TRABAJO DE GRADUACIÓN

CARACTERIZACIÓN PATOLÓGICA DE CEPAS DEL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, AISLADAS DE AGUACATE (*Persea americana* Mill), ANONA (*Annona sp*) Y SERVICIOS REALIZADOS EN LA ESTACIÓN ICTA-CISUR-CUYUTA, MASAGUA, ESCUINTLA

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

POR

ANTONIO FORTUNATO HERNÁNDEZ LÓPEZ

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADO

GUATEMALA, julio de 2009

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 Aroldo Reyes Sanabria
VOCAL III	MSc. Danilo Ernesto Dardón Ávila
VOCAL IV	Br. Rigoberto Morales Ventura
VOCAL V	Br. Miguel Armando Solazar Donis
SECRETARIO	MSc. Edwin Enrique Cano Morales

Guatemala, julio de 2009

Guatemala, julio de 2009

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., aisladas de aguacate (*Persea americana* Mill), anona (*Annona sp*) y servicios realizados en la estación ICTA-CISUR-Cuyuta, Masagua, 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”

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio F. Hernández López', with a horizontal line drawn across the middle of the signature.

Antonio F. Hernández López.

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

Por haberme dado el don de la vida, sabiduría y empuje para la realización de este trabajo de graduación.

MIS PADRES

José Hernández Silvestre y María Francisca López, por ser mi principal ejemplo de vida, mis amigos, las personas a las que les debo absolutamente todo lo que tengo y todo lo que soy, por ser ellos quienes constantemente me han apoyado y me dan voz de aliento para salir adelante en cada uno de mis tropiezos.

MIS HERMANOS

Manuela, Angelina, Isidora, Gloria, Gabriela, Ángel, Micaela y Albertina, por que sin ellos mi vida no sería la misma, por ser mis confidentes, mis consejeros, las personas con las que puedo contar para las que sea.

A MI PRIMO

Jesús Antonio Camposeco por su valiosa amistad y los momentos compartidos de alegrías y tristezas durante la carrera.

MI FAMILIA EN GENERAL

Como muestra de cariño y respeto.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por la formación que me aportó para la ejecución de la tesis.

Al Centro de Innovación Tecnológica del Sur del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA-CISUR), de Cuyuta, Masagua, Escuintla.

Al Dr. David Monterroso Salvatierra, Director del Área Integrada y Líder de la Disciplina de Fitopatología de la FAUSAC, por el amplio conocimiento que me aportó, su apoyo y paciencia en la conducción de este trabajo de Graduación.

A mis asesores Ing. Gustavo Álvarez y al MSc. Amílcar Sánchez. Por su ayuda y valiosas observaciones en todas las etapas del trabajo.

A mis amigos Gilberto Sutuj Guerra, Ariel Reyes, Santiago Cobos, Osvin Ruyan, Rony Mijangos, Sherwood Ramírez, por su amistad y apoyo en la carrera.

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

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	viii
CAPÍTULO I. DIAGNÓSTICO.....	1
Diagnóstico de plagas y enfermedades del programa de frutales tropicales del Centro de Innovación Tecnológica del Sur, del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.	1
I. Presentación.....	2
II. Marco referencial.....	3
2.1 Ubicación geográfica.....	3
2.2 Clima y ecología.....	5
2.3 Suelos y topografía.....	6
2.4 Aspectos Económicos.....	8
2.5 Agricultura.....	8
2.6 Recursos hidráulicos.....	8
III. Objetivos.....	9
3.1 General.....	9
3.2 Específicos.....	9
IV. Metodología.....	10
4.1 Obtención de Información.....	10
4.1.1 Observación.....	10
4.1.2 Trabajo de laboratorio.....	10
4.1.3 Revisión de literatura.....	10
4.1.4 Sistematización de la información.....	10
4.1.5 Matriz de problemas.....	10
V. Resultados.....	11
5.1 Matriz de problemas.....	11
5.2 Enfermedades.....	12
5.2.1 Mancha Johnston (<i>Pyricularia grisea</i> Cavara) en Banano.....	12
5.2.2 Mancha Diamante (<i>Cercospora hayi</i>) en Banano.....	12
5.2.3 Antracnosis (<i>Colletotrichum musae</i> (Berk. & M.A.Curtis) Arx) en Banano.....	13
5.2.4 Mancha cordana (<i>Cordana musae</i> (Zimm) Höhnel) en Banano.....	13
5.2.5 Bacteriosis foliar (<i>Erwinia stewartii</i> (Smith) Dye) en hoja de Palmito.....	14
5.2.6 Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>) en hoja de Palmito.....	14
5.2.7 Mancha foliar (<i>Cercospora palmivora</i>) en hoja de palmito.....	15
5.2.8 Mal del almacigo (<i>Phytophthora palmivora</i> Butler) en palmito.....	15
5.2.9 Mancha foliar (<i>Cercospora sp</i>) en hoja palmito.....	16
5.2.10 Virus de la Leprosis de los cítricos (CiVL) en fruto naranja.....	16
5.2.11 Cancrosis de lo cítricos (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri) en fruto naranja.....	17
5.2.12 Antracnosis (<i>Gloesporium limeticola</i>) en hoja y fruto limón.....	17
5.2.13 Verugosis (<i>Sphaceloma sp</i>) en hoja y tallo Limón.....	18
5.2.14 Fumagina (<i>Capnodium citri</i>) en hoja y fruto de cítricos.....	18
5.2.15 Fieltro o cuero (<i>Septobacidium pseudopedicellatum</i>) en tallo y hoja de lima.....	19
5.2.16 Verrugosis (<i>Cladosporium herbarum</i>) en hoja y fruto de maracuyá.....	19
5.2.17 Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz) Sacc) en Fruto maracuyá.....	20
5.2.18 Pudrición radicular (<i>Fusarium solani</i>) en raíz de maracuyá.....	20
5.2.19 Pudrición blanda (<i>Phytophthora palmivora</i> Butler) en fruto de papaya.....	21
5.2.20 Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>) en fruto papaya.....	21

5.2.21 Pudrición radicular (<i>Fusarium solani</i>) en raíz de papaya	22
5.2.22 Viruela (<i>Asperosporium caricae</i>) en hoja de papaya	22
5.2.23 Mancha blanca (<i>Corynespora cassicola</i> Weir) en hoja de papaya.....	23
5.3 Plagas.....	23
5.3.1 Pulgón negro (<i>Pentalonia nigronervosa</i> Coquerel) en Banano	23
5.3.2 Picudo negro (<i>Cosmopolites sordidus</i>) en plátano.....	24
5.3.3 Picudo del palmito (<i>Rhynchophorus palmarum</i>) en palmito	24
5.3.4 Minador de cítricos (<i>Phyllocnistis citrella</i> Stainton)	25
5.3.5 Ácaro de la leprosis (<i>Brevipalpus phoenicis</i>) en varios cultivos	25
5.3.6 Mosca de los frutos (<i>Anastrepha distincta</i> Greene) en palmito.....	26
5.3.7 Beauveria en picudo de palmito (<i>Beauveria bassiana</i> Vuill) en palmito	26
VI. Conclusiones.....	27
VII. Recomendaciones.....	27
VIII. Bibliografía	28
CAPÍTULO II. INVESTIGACIÓN.....	29
Caracterización patológica y diagnóstico molecular de cinco cepas del hongo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz) Penz & Sacc, aisladas de aguacate y anona y evaluación de protección cruzada como alternativa para manejo postcosecha en la estación ICTA-CISUR-Cuyuta, Masagua, Escuintla	29
I. Presentación.....	30
II. Marco conceptual.....	32
2.1 Antracnosis	32
2.1.1 Descripción	32
2.1.2 Clasificación Taxonómica.....	33
2.1.3 Síntomas.....	35
2.1.4 Condiciones ambientales	35
2.1.5 Ciclo Patológico de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	36
2.1.6 Manejo de Postcosecha	37
2.2 Estrategias de penetración de <i>Colletotrichum</i>	37
2.2.1 Penetración intracelular hemibiotrófica.....	37
2.2.2 Penetración necrotrófica intramural, subcuticular	38
2.3 Métodos e identificación de <i>Colletotrichum</i>	40
2.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en Ingles).....	41
2.3.2 Espaciadores de Transcripción Interna (ITS, por sus siglas en Ingles).....	42
2.4 <i>Colletotrichum</i> en el cultivo de Anona	43
2.5 <i>Colletotrichum</i> en el cultivo de Aguacate.....	44
2.6 Infección cruzada.....	44
2.7 Resistencia inducida	45
2.8 Protección cruzada	45
III. OBJETIVOS.....	47
3.1 General.....	47
3.2 Específicos	47
IV. HIPÓTESIS	48
V. Metodología.....	49
5.1 Trabajo de Campo	49
5.1.1 Caracterización de síntomas y signos	49
5.1.2 Toma y traslado de material enfermo	49
5.2 Trabajo de Laboratorio.....	49
5.2.1 Caracterización de síntomas y signos	49

5.2.2 Cámara húmeda	49
5.3 Obtención de aislamientos de <i>Colletotrichum</i>	50
5.3.1 Siembra en medio de cultivo	50
5.3.2 Incubación.....	51
5.3.3 Obtención de cepas	51
5.3.4 Caracterización <i>In vitro</i>	51
5.3.5 Cultivos monospóricos o monoconidial.....	51
5.4 Diagnóstico molecular	52
5.4.1 Multiplicación del micelio	52
5.4.2 Liofilización del micelio	53
5.4.3 Procedimiento para la Extracción de ADN (Zolan y Pukkila, 1986).....	53
5.4.4 Electroforesis	54
5.4.5 Amplificación por PCR	55
5.4.6 Sistema de Purificación Directa de ADN a Partir de Amplificaciones de PCR	56
5.4.7 Secuenciación de las cepas de <i>Colletotrichum</i>	56
5.5 Pruebas de patogenicidad e infección cruzada	57
5.5.1 Protección de frutos de aguacate y anona en el campo	57
5.5.2 Pruebas de patogenicidad.....	58
5.5.3 Pruebas de infección cruzada	58
5.6 Pruebas de Protección cruzada	59
5.6.1 Prueba de protección cruzada en frutos aguacate.....	59
5.6.2 Prueba de protección cruzada en anona	59
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
6.1 Caracterización de Campo.....	60
6.1.1 Aguacate.....	60
a. Fruto.....	60
b. Hoja.....	61
c. Flores	61
6.1.2 Anona.....	61
a. Flores y Frutos	61
b. Hoja.....	62
6.2 Aislamientos de cepas de <i>C. gloeosporioides</i>	62
6.2.1 Obtención de cepas	63
6.2.2 Caracterización morfométrica de cepas	64
6.2.2.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado en hoja de Anona (CAHAnC ₁)	64
6.2.2.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado en fruto de Anona (CAFrAnC ₂).....	65
6.2.2.3 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado en hoja de Aguacate (CAHAgC ₁)	66
6.2.2.4 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado en flor de Aguacate (CAFIAGC ₂).....	67
6.2.2.5 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado en fruto de Aguacate (CAFIAGC ₃).....	68
6.3 Diagnóstico molecular de cepas.....	69
6.4 Pruebas de patogenicidad.....	70
6.4.1 Pruebas de patogenicidad en aguacate	70
6.4.2 Pruebas de patogenicidad en anona	70
6.5 Pruebas de infección cruzada	71
6.5.1 Pruebas de infección cruzada en aguacate.....	71
6.5.2 Pruebas de infección cruzada en anona.....	72
6.6 Pruebas de Protección cruzada	74
VII. CONCLUSIONES.....	75
VIII. RECOMENDACIONES.....	75
IX. BIBLIOGRAFÍA	76
IX. ANEXOS	79

Anexo 1. Glosario	79
Anexo 2. Clave taxonómica de melanconiales	81
Anexo 3. Métodos de penetración e invasión por hongos	82
Anexo 4. Aislamiento de hongos patógenos del tejido una planta infectada.....	83
Anexo 5. Preparación de medios de cultivo sólidos en cajas Petri y tubos de ensayo	83
Anexo 6. Comprobante de orden de secuenciación de cepas de <i>Colletotrichum</i>	84
Anexo 7. Manejo Poscosecha de la Anona.....	85
Anexo 8. Secuencias de cepas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	86
CAPÍTULO III. SERVICIOS	87
Servicios realizados en el Centro de Innovación Tecnológica del Sur del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.	87
I. Presentación.....	88
II. Objetivos.....	89
III. Servicios realizados	90
3.1 Servicio 1. Rotulación de especies frutícolas	90
3.1.1 Objetivo.....	90
3.1.2 Metodología	90
3.1.2.1 Adquisición de los materiales	90
3.1.2.2 Corte de rótulos.....	90
3.1.2.3 Unión de rótulos y soporte.....	91
3.1.2.4 Pintado de rótulos	91
3.1.2.5 Contenido de rótulos	91
3.1.2.6 Colocación de rótulos	91
3.1.3 Resultados	91
3.1.4 Evaluación	92
3.2 Servicio 2. Elaboración de CD interactivo	92
3.2.1 Objetivo.....	92
3.2.2 Metodología	92
3.2.2.1 Adquisición de materiales.....	92
3.2.2.2 Procesamiento de datos.....	92
3.2.2.3 Elaboración del CD.....	92
3.2.3 Resultados	93
3.2.4 Evaluación	93
3.3 Servicio 3. Elaboración de Cepario	94
3.3.1 Objetivo.....	94
3.3.2 Metodología	94
3.3.3 Resultados	94
3.3.4 Evaluación	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.	3
Figura 2. Centro de producción ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.....	4
Figura 3. Parcelamiento Cuyuta, Masagua, Escuintla.....	5
Figura 4. Clasificación técnica por capacidad de uso de la tierra.	6
Figura 5. El sistema de clasificación con base en la Capacidad-fertilidad.....	6
Figura 6. Mapa clasificación con base en la Capacidad-fertilidad.	7
Figura 7. Intensidad de uso de la tierra.	8
Figura 8. Fruto de banano afectado por <i>Pyricularia grisea</i>	12
Figura 9. Fruto de banano afectado por <i>Cercospora hayi</i>	12
Figura 10. Fruto de Banano afectado por <i>Colletotrichum musae</i>	13
Figura 11. Hoja de banano afectado por <i>Cordana musae</i>	13
Figura 12. Vector (<i>Chaetocnema pulicaria</i>) y hoja de palmito afectado por <i>Erwinia stewartii</i>	14
Figura 13. Hoja de palmito afectado por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	14
Figura 14. Hoja de palmito afectado por <i>Cercospora palmivora</i>	15
Figura 15. Tallo de palmito afectados por <i>Phytophthora palmivora</i>	15
Figura 16. Hojas de palmito afectados por <i>Cercospora sp.</i>	16
Figura 17. Fruto de naranja afectado por CiLV.	16
Figura 18. Síntomas de <i>Xanthomonas axonopodis</i> en hojas y fruto de naranja.	17
Figura 19. Hojas y fruto de limón afectados por <i>Gloesporium limeticola</i>	17
Figura 20. Hoja, fruto y tallo de limón afectadas por <i>Sphaceloma sp.</i>	18
Figura 21. Hojas de cítricos afectadas por <i>Capnodium citri</i>	18
Figura 22. Hojas de lima afectadas por <i>Septobacidium pseudopedicellatum</i>	19
Figura 23. Hojas y frutos de maracuyá afectadas por <i>Cladosporium herbarum</i>	19
Figura 24. Fruto de maracuyá afectado por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	20
Figura 25. Raíces de maracuyá afectadas por <i>Fusarium solani</i>	20
Figura 26. Frutos de papaya afectados por <i>Phytophthora palmivora</i>	21
Figura 27. Fruto de papaya afectado por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	21
Figura 28. Raíces de papaya afectada por <i>Fusarium solani</i>	22
Figura 29. Hojas de papaya afectadas por <i>Asperosporium caricae</i>	22
Figura 30. Hoja de papaya afectada por <i>Corynespora cassicola</i>	23
Figura 31. Pulgón negro (<i>Pentalonia nigronervosa</i>).	23
Figura 32. Picudo negro (<i>Cosmopolites sordidus</i>).	24
Figura 33. Picudo del palmito (<i>Rhynchophorus palmarum</i>).	24
Figura 34. Síntomas y adulto del Minador de cítricos (<i>Phyllocnistis citrella</i> Stainton).....	25
Figura 35. Ácaro de la leprosis (<i>Brevipalpus phoenicis</i>).	25
Figura 36. Mosca de los frutos (<i>Anastrepha distincta</i> Greene).	26
Figura 37. Adulto del picudo rayado (<i>Metamasius hemipterus</i>) atacado por <i>Beauveria bassiana</i>	26
Figura 38. Acérvulo de <i>Colletotrichum</i>	32
Figura 39. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . a) Acérvulos y b) Conidias.	32
Figura 40. Conidias y apresorios de especies de <i>Colletotrichum</i> de interés fitopatológico.	34
Figura 41. Ciclo de la enfermedad de la antracnosis en frutos de Anona (<i>Annona cherimola</i> Mill.).....	36
Figura 42. Diseño esquemático de diferentes interacciones de patógeno-hospedero y estrategias de infección de <i>Colletotrichum acutatum</i>	39
Figura 43. Formación de una cubierta protectora en torno a una hifa (H) que perfora la pared celular (CW).....	40
Figura 44. Esquematisación del proceso de PCR.	42
Figura 45. Unidad repetitiva de los rADN en el proceso de amplificación del ITS1 e ITS4.	43

Figura 46. Síntomas de antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz) Penz & Sacc).....	43
Figura 47. Frutos de aguacate y anona colocadas en cámara húmeda para la realización de aislamientos de <i>C. gloeosporioides</i>	50
Figura 48. Montajes de <i>C. gloeosporioides</i> realizados en frutos de anona.....	50
Figura 49. Cajas Petri con extracto malta-agar (EMA).	50
Figura 50. Incubación de aislamientos.	51
Figura 51. Protección de frutos de anona para las pruebas de patogenicidad e infección cruzada.....	57
Figura 52. Antracnosis en frutos de aguacate causada por <i>C. gloeosporioides</i>	60
Figura 53. Mancha foliar en hojas de aguacate causada por <i>C. gloeosporioides</i>	61
Figura 54. Daños en frutos de anona causado por <i>C. gloeosporioides</i>	61
Figura 55. Antracnosis en hojas de anona causada por <i>C. gloeosporioides</i>	62
Figura 56. Desarrollo monospórico de <i>C. gloeosporioides</i> a los 4 días de siembra.....	62
Figura 57. Cepas monospóricas aisladas de anona (izquierda) y aguacate (derecha).....	63
Figura 58. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de anona.	64
Figura 59. Conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de anona.	64
Figura 60. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de anona.	65
Figura 61. Conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de anona.	65
Figura 62. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de aguacate.....	66
Figura 63. Conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de aguacate.....	66
Figura 64. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en flor de aguacate.	67
Figura 65. Conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en flor de aguacate.	67
Figura 66. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de aguacate.	68
Figura 67. Conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de aguacate.	68
Figura 68. Separación en gel de agarosa al 0.8% de productos amplificados por PCR para las regiones ITS del ADN ribosomal de las cepas de <i>C. gloeosporioides</i> aislados en aguacate y anona.	69
Figura 69. Árbol Filogenético de cepas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	69
Figura 70. Recolección y desinfestación de frutos de aguacate.....	70
Figura 71. Pruebas de patogenicidad en frutos y hojas de aguacate.	70
Figura 72. Pruebas de patogenicidad en fruto y hoja de anona.	70
Figura 73. Pruebas de infección cruzada de cepas de anona en frutos de aguacate.....	71
Figura 74. Pruebas de infección cruzada de cepas anona en hojas en aguacate.	71
Figura 75. Pruebas de infección cruzada de cepas de aguacate en frutos de anona.....	72
Figura 76. Pruebas de infección cruzada de cepas de aguacate en hojas de anona.	73
Figura 77. Adquisición de materiales para la rotulación.	90
Figura 78. Corte de rótulos.	90
Figura 79. Pintado de rótulos.	91
Figura 80. Colocación de rótulos.....	91
Figura 81. Presentación del CD interactivo.	93
Figura 82. Contenido CD Interactivo, Cultivo del Aguacate.....	93
Figura 83. Fragmentos de papel filtro para la realización de copias de cepas.	94
Figura 84. Cepario de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	95

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Matriz de Problemática.....	11
Tabla 2. Características morfológicas más importantes para separar cinco especies de <i>Colletotrichum</i> interés fitopatológica.	34
Tabla 3. Codificación de cepas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	51
Tabla 4. Procedimiento para la elaboración de Master Mix.....	55
Tabla 5. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de anona.....	64
Tabla 6. Dimensión de conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de anona.....	64
Tabla 7. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de anona.	65
Tabla 8. Dimensión de conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de anona.	65
Tabla 9. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de aguacate.....	66
Tabla 10. Dimensión de conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de aguacate.....	66
Tabla 11. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en flor de aguacate.....	67
Tabla 12. Dimensión de conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en flor de aguacate.....	67
Tabla 13. Características de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de aguacate.....	68
Tabla 14. Dimensión de conidias de <i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de aguacate.....	68

RESUMEN

El Ejercicio Profesional Supervisado (EPS), realizado en el periodo de febrero-noviembre de 2007, fue ejecutado en el Centro de Innovación Tecnológica del Sur (ICTA-CISUR), ubicado en la aldea Cuyuta, Masagua, Escuintla, en donde se trabajan programas de investigación, y para el desarrollo del ejercicio profesional supervisado se seleccionó la línea de investigación de frutales tropicales.

El diagnóstico fue elaborado para el reconocimiento de las plagas y enfermedades que afectan a los diferentes cultivos establecidos en el área de frutales. Las plagas incluidas en el diagnóstico, fueron determinadas en el laboratorio de fitopatología y entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Siendo la de mayor incidencia y daño *Colletotrichum gloeosporioides*, ya que afecta a un mayor número de hospederos, y dentro de las plagas, se pudo determinar que la mosca de la fruta (*Anastrepha distincta*), es mas daño causa, ya que esta ataca directamente a los frutos de los diferentes árboles frutales.

La investigación fue financiada con fondos de la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), tuvo la finalidad de estudiar al hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, que causa la antracnosis en los cultivos de aguacate y anona, ya que de la información obtenida del mismo será de gran interés para la búsqueda de nuevas alternativas de manejo de la enfermedad, como lo es la protección cruzada.

Los resultados obtenidos de la caracterización patológica, nos demuestran que las cepas aisladas de aguacate y anona son patógenos agresivos tanto en anona como aguacate, de igual manera se pudo constatar que existe el fenómeno de infección cruzada entre las diferentes cepas aisladas, descartando la posibilidad de protección cruzada como manejo de la antracnosis post-cosecha.

El área de frutales cuenta con una diversidad de especies que aun no han sido rotulados o identificados, tales como: aguacate, anona, guayaba, mango, papaya, carambola, etc. Siendo este uno de los mas 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 arboles frutales del parcelamiento.

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola es una entidad del estado que en parte se encarga de brindar información técnica a la persona que desea solicitarla, y de ahí surge el servicio de la elaboración de un CD interactivo, el cual contiene la información técnica de los diferentes especies de frutales ubicados en el parcelamiento. El CD interactivo contiene información como la clasificación taxonómica, requerimientos edafoclimáticos, manejo de plagas y enfermedades, entre otros temas de interés.

El tercer servicio consistió en la elaboración de un cepario de Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) aislados en Anona, Aguacate, Carambola, Papaya, Mango y Guayaba.

CAPÍTULO 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 Agrícola ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.

I. Presentación

El Centro de Innovación Tecnológica del Sur (ICTA-CISUR) trabaja con diferentes programas de investigación, los cuales generan información utilizada en el desarrollo de nuevas técnicas en el manejo de los cultivos, como lo es el manejo de plagas y enfermedades, principalmente en frutales tropicales. La comercialización de estos frutos es de gran importancia para el Centro de Investigación, ya que de aquí se obtienen ingresos, de los cuales sirven para absorber parte de los gastos que requiere el mantenimiento del programa de frutales.

El presente diagnóstico fue elaborado para el reconocimiento de las plagas y enfermedades que afectan a los diferentes cultivos establecidos en el área de frutales. Las plagas incluidas en el diagnóstico, fueron determinadas en el laboratorio de fitopatología y entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Las plagas y enfermedades de los cultivos son uno de los factores limitantes en la producción agrícola y la determinación precisa de los mismos es un paso básico e indispensable para el diseño de una estrategia de manejo integrado.

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.

Se logró establecer e identificar las diferentes plagas y enfermedades presentes en el programa de frutales. Generando información útil para la búsqueda de nuevos proyectos de investigación. Siendo la de mayor incidencia y daño *Colletotrichum gloeosporioides*, ya que afecta a un mayor número de hospederos, y dentro de las plagas, se pudo determinar que la mosca de la fruta (*Anastrepha distincta*), es la que mayor daño causa, ya que esta ataca directamente a los frutos de los diferentes árboles frutales.

II. Marco referencial

2.1 Ubicación geográfica

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola del Sur (ICTA-CISUR), se encuentra localizado en la vertiente sur de la República de Guatemala (*ver Fig. 1*), en las coordenadas 14° 07' latitud Norte y 71° 09' longitud Oeste, inserta en el Parcelamiento Cuyuta, del Municipio de Masagua, Escuintla, ubicado en el kilómetro 83.5 a 47 msnm por la antigua carretera que conduce al Puerto de San José (Matta, G. 1984). Cuenta con un área total de 221.57 ha, teniendo 24 parcelas aprovechables con un área total de 199.47 ha, de las cuales tienen diferentes funciones de producción (*ver fig. 2*) (Quiñones, J. 2006).

ALDEA CUYUTA, MASAGUA, ESCUINTLA

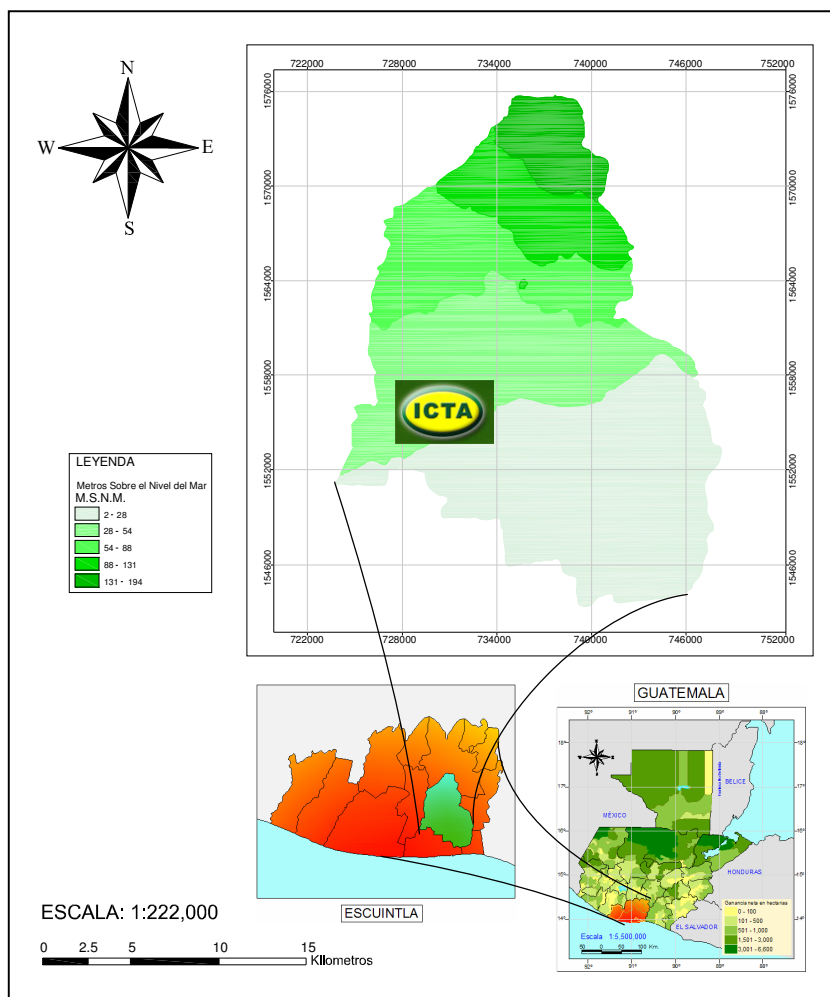


Figura 1. Localización del ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.
 Fuente: Autor, generado en el programa de ArcGis 9.2

CENTRO DE PRODUCCIÓN ICTA-CUYUTA

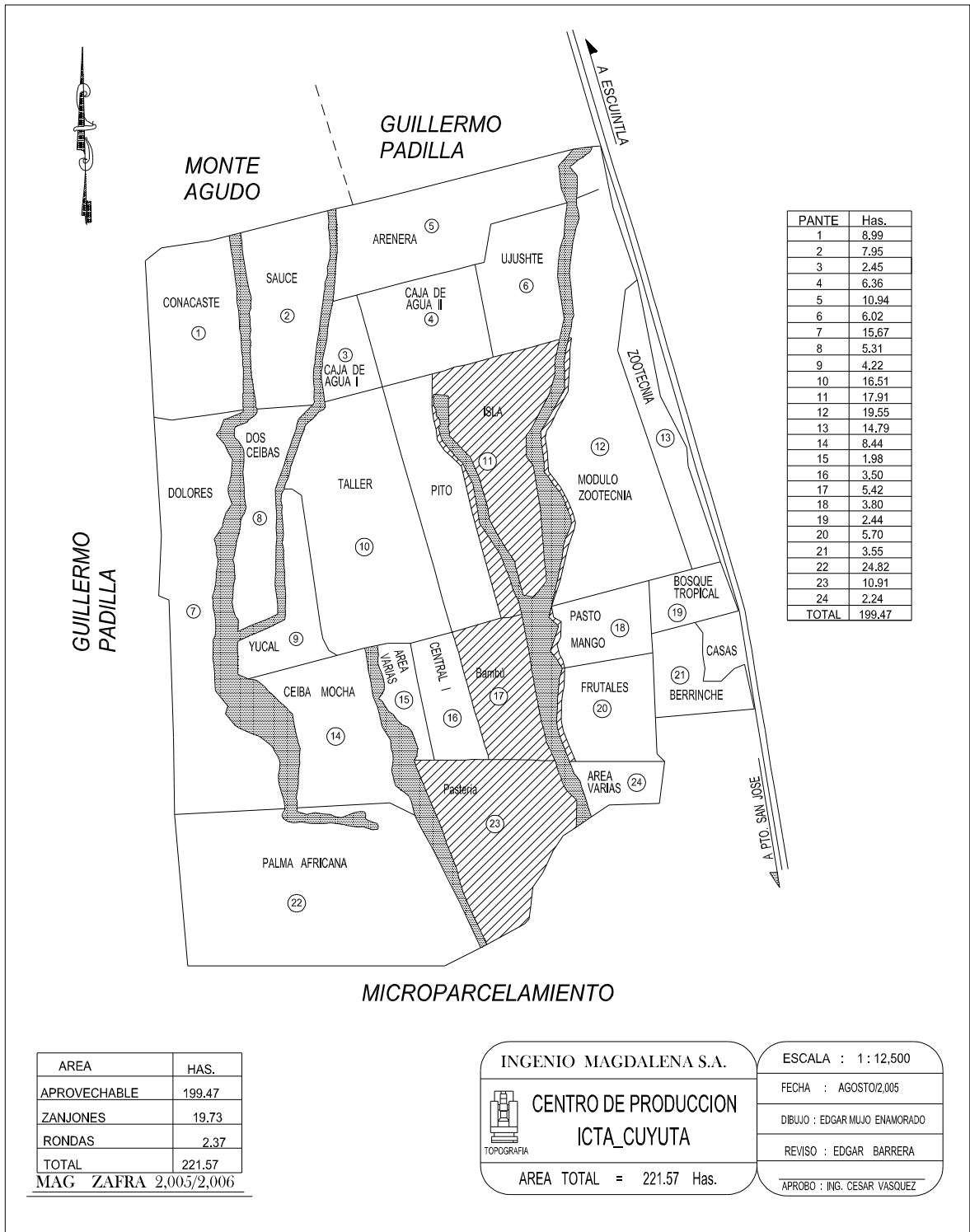
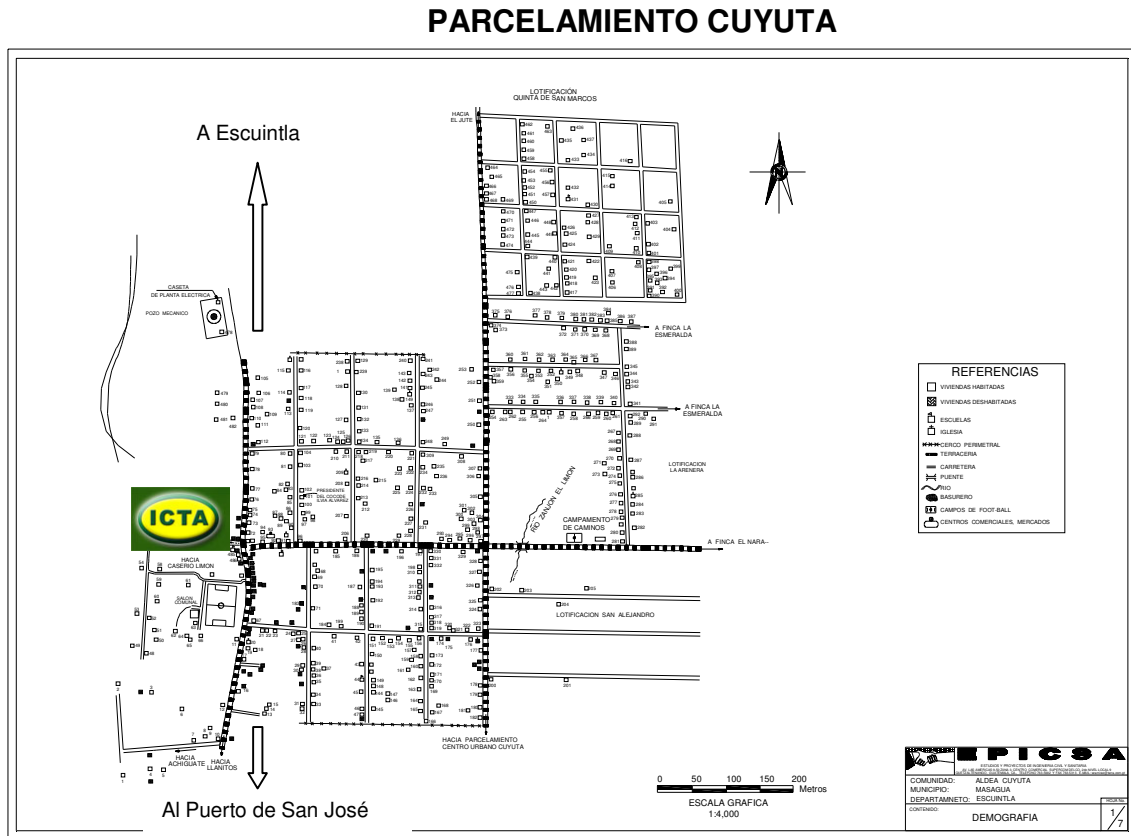


Figura 2. Centro de producción ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.
Fuente: Vásquez, C. 2005.

El parcelamiento Cuyuta, se encuentra localizado en el municipio de Masagua, del departamento de Escuintla (Ver figura 3); se sitúa geográficamente entre $90^{\circ} 49'$ y $90^{\circ} 55'$ longitud Oeste y entre las paralelas $14^{\circ}02'$ y $14^{\circ}08'$ latitud Norte (Carbajal, EA. 1992).



2.2 Clima y ecología

Según la clasificación de zona de vida por Holdridge, el ICTA pertenece a la zona bioclimática de bosques muy húmedo sub-tropical cálido (bmh-s (c)), tiene dos estaciones bien marcadas, una muy seca y otra muy húmeda con una precipitación variable, alcanzando promedios de 2,000 mm anuales, pudiendo sobrepasar los 2,500 mm en años lluviosos. Los meses secos son de noviembre a abril, iniciándose la época de lluvia en el mes de mayo, siendo de mayor intensidad de julio a octubre (Carbajal Segura, EA. 1992).

El área presenta un clima cálido, con una oscilación de 14°C en las temperaturas máxima y mínima que van de 18 a 32°C . La elevación va de 38 a 48 metros sobre el nivel del mar (MSNM). Los vientos alcanzan, regularmente, velocidades entre 12 y 22 km/h,

según la época del año, existiendo eventualmente vientos huracanados que superan lo 40 km/h, y se presentan en el mes de septiembre (Matta, G. 1984).

2.3 Suelos y topografía

La estación experimental ICTA-Cuyuta se encuentra enmarcada dentro de la serie de suelo Tiquisate; por consiguiente, 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 agrologica I, II y III, estos suelos son propicios para bosques tropicales y deciduos. El parcelamiento cuenta con relieves casi planos, con desniveles de 3 a 4% (Matta, G. 1984).

En la clasificación técnica por Capacidad de uso de la tierra se definió la clase II: 78.97% y clase III: 34.52%. (Cifuentes, ED. 2004)

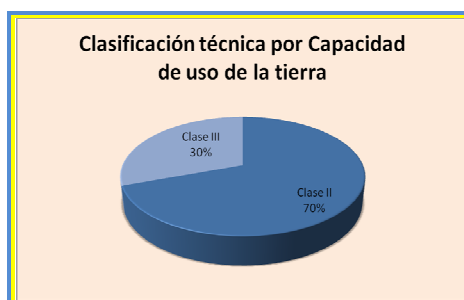


Figura 4. Clasificación técnica por capacidad de uso de la tierra.
Fuente: Cifuentes, E. 2004

El sistema de clasificación con base en la Capacidad-fertilidad permitió la identificación de dos grupos de suelos: **a) Francos**, 144.5 has: L, 17 has., LC, 22 has., LS, 105.22 has. **b) Arenosos**, 77.22 has: con Baja Capacidad de Intercambio Catiónico (Se), 30.95 has, baja disponibilidad de potasio y baja CIC (SKe), 27.8 has. (Cifuentes, ED. 2004)



Figura 5. El sistema de clasificación con base en la Capacidad-fertilidad.
Fuente: Cifuentes, E. 2004

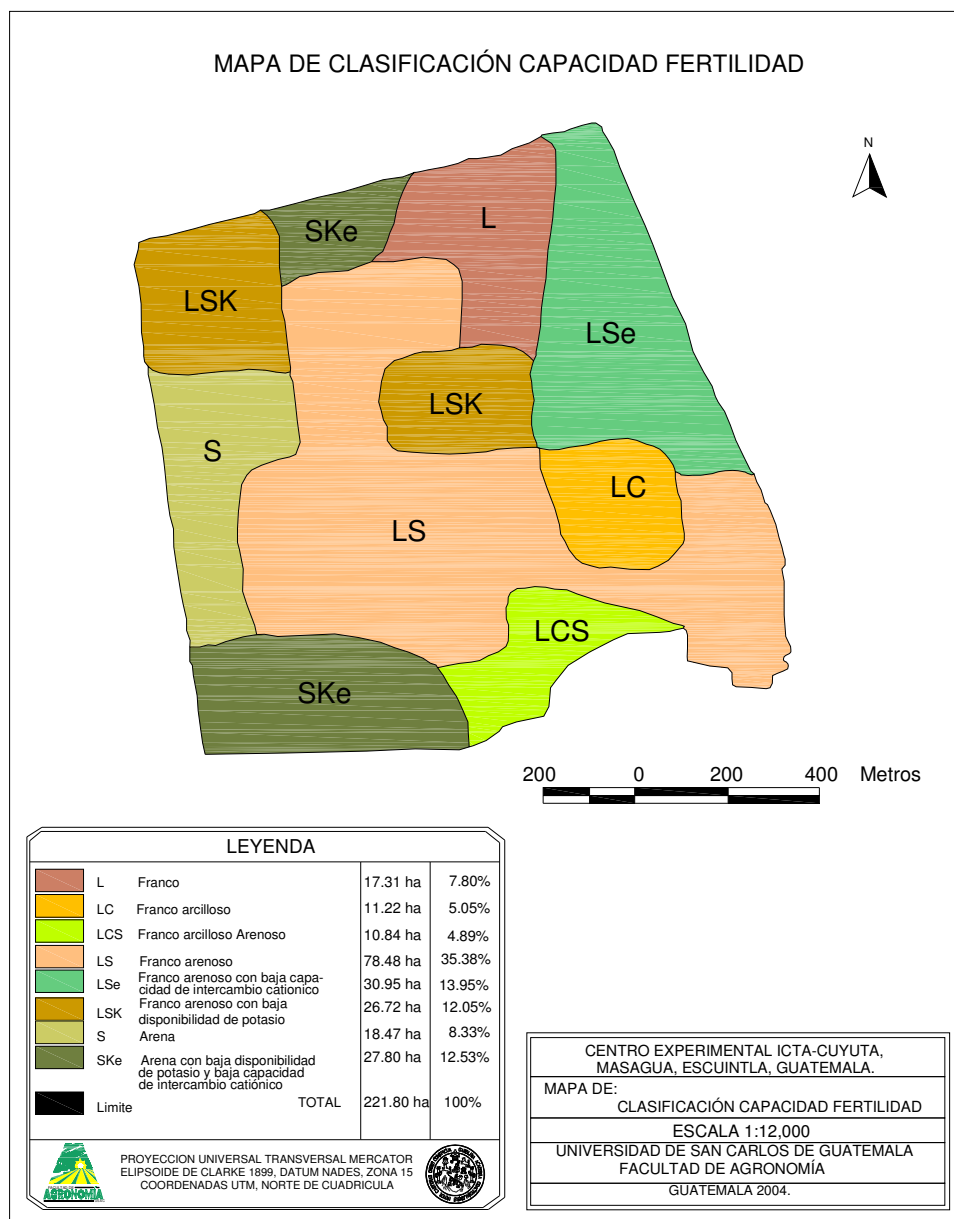


Figura 6. Mapa clasificación con base en la Capacidad-fertilidad.

Fuente: Cifuentes, E. 2004.

Clasificación por uso e intensidad del uso de la tierra: Que el 43% de la tierra se utiliza para la producción de semilla de maíz, ajonjolí y arroz; el 23 % para el cultivo de sistemas silvopastoriles; el 13% para cultivo de sistemas forestales; el 10% para el cultivo de pastos; el 7% para área urbana y administración y el 6% para cultivo de frutales tropicales (Cifuentes, ED. 2004).

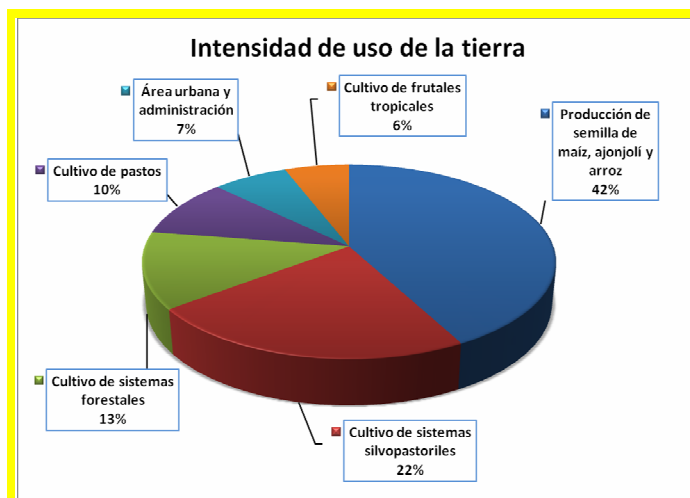


Figura 7. Intensidad de uso de la tierra.

Fuente: Cifuentes, E. 2004.

2.4 Aspectos Económicos

Puede apreciarse que la explotación de las parcelas es de tres formas: explotación agrícola, ganadera y mixta. Dentro de la explotación agrícola el principal cultivo son los árboles frutales (Matta, G. 1984).

2.5 Agricultura

El ICTA, cuenta con varias áreas de producción dentro de los que se pueden mencionar: Proyecto de bambú, proyecto de maíz, proyecto de frutales (mango, guayaba, anona, papaya, carambola, aguacate, limón, naranja, chico, zapote, marañón, toronja, mamey, plátano, banano, manzana de agua), producción de sorgo y trigo, producción de sistemas pastoriles, producción forestal (Teca, Cedro, Caoba) (Sierra, O. 2006)¹.

2.6 Recursos hidráulicos

Los recursos hidráulicos con que cuenta el parcelamiento es el agua subterránea que se utiliza para consumo domestico y abrevaderos por medio de pozos construidos a manos (Carbajal Segura, EA. 1992).

¹ Comunicación personal, Ingeniero Agrónomo, Coordinador de Frutales del Centro Experimental ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla.

III. Objetivos

3.1 General

- Contribuir con información técnica de plagas y enfermedades del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola del Sur (**ICTA-CISUR**), en el Proyecto de Frutales del parcelamiento Cuyuta, Masagua, Escuintla.

3.2 Específicos

- Identificar los problemas de plagas y enfermedades de importancia económica que presenta la producción de frutales del **ICTA-CISUR**, Cuyuta.
- Generar nueva información para la elaboración de proyecto de servicios e investigación que promuevan posibles soluciones a los problemas de plagas y enfermedades.

IV. Metodología

Para la realización del diagnóstico de plagas y enfermedades en el proyecto de frutales del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola del Sur (ICTA-CISUR) de Cuyuta, se utilizó la información obtenida mediante entrevistas personales 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.

4.1 Obtención de Información

4.1.1 Observación

Se realizaron recorridos dentro del área de frutales del Centro de Investigación, 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 las diferentes especies de frutales. Así mismo se realizó un croquis del área siendo de esta manera más fácil ubicar los cultivos.

4.1.2 Trabajo de laboratorio

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

4.1.3 Revisión de literatura

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

4.1.4 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.

4.1.5 Matriz de problemas

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

V. Resultados

5.1 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 programas de frutales, seguido de la falta de recursos para mantenimiento de los mismos, así mismo la falta de control de plagas y enfermedades es limitada. Esta matriz se elaboró con el Ing. Otoniel Sierra, encargado del programa de frutales, en el cual se 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 y enfermedades. Seguido de este problema se encuentra la falta de recursos interviniendo en el control de las mismas.

Tabla 1. 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

	Problema	Frecuencia
1	Control de plagas	0
2	Control de enfermedades	1
3	Falta de información técnica	5
4	Falta de recursos	3
5	Parcelas demostrativas representativas	3
6	Falta de divulgación	3

5.2 Enfermedades

5.2.1 Mancha Johnston (*Pyricularia grisea* Cavara) en Banano

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.



Figura 8. Fruto de banano afectado por *Pyricularia grisea*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.2 Mancha Diamante (*Cercospora hayi*) en Banano

Ocurre en los pedúnculos, corono y fruto. 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 las manchas se extienden a los tejidos y se tornan de color negro y la parte central se agrietan, exponiendo la pulpa del fruto.



Figura 9. Fruto de banano afectado por *Cercospora hayi*.

Fuente: Fotografía tomada en el campo, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.3 Antracnosis (*Colletotrichum musae* (Berk. & M.A.Curtis) Arx) en Banano

En los frutos aparecen primero puntos necróticos que se 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.



Figura 10. Fruto de Banano afectado por *Colletotrichum musae*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.4 Mancha cordana (*Cordana musae* (Zimm) Höhnel) en Banano

Hoja

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 por completo toda la hoja.



Figura 11. Hoja de banano afectado por *Cordana musae*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.5 Bacteriosis foliar (*Erwinia stewartii* (Smith) Dye) en hoja de Palmito

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, hasta incluso causarle la muerte a 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.

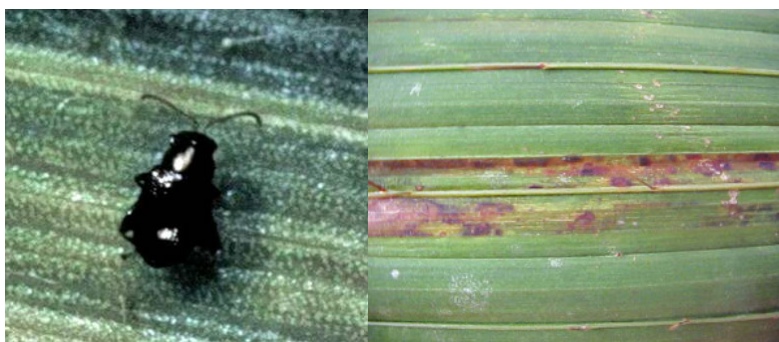


Figura 12. Vector (*Chaetocnema pulicaria*) y hoja de palmito afectado por *Erwinia stewartii*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.6 Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en hoja de Palmito

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 afectando la fotosíntesis.

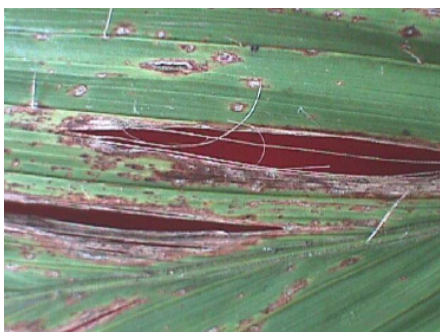


Figura 13. Hoja de palmito afectado por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.7 Mancha foliar (*Cercospora palmivora*) en hoja de palmito

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



Figura 14. Hoja de palmito afectado por *Cercospora palmivora*.
Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por el Autor.

5.2.8 Mal del almacigo (*Phytophthora palmivora* Butler) en palmito

A nivel del cuello se presenta estrías necróticas, la hoja bandera de las plántulas afectadas se desprende fácilmente por pudrición de la base.



Figura 15. Tallo de palmito afectados por *Phytophthora palmivora*.
Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.9 Mancha foliar (*Cercospora sp*) en hoja palmito

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



Figura 16. Hojas de palmito afectados por *Cercospora sp*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.10 Virus de la Leprosis de los cítricos (CiVL) en fruto naranja

En hojas la enfermedad se manifiesta como anillos cloróticos con centro verde. Conforme la enfermedad avanza, estos anillos se llenan de estrías necróticas y se vuelven de color café. En tallos se presentan anillos necróticos con centro verde. A medida que la enfermedad avanza estos anillos se unen formando grandes áreas de tejido necrótico fácilmente desprendible. En frutos se observan manchas necróticas rodeadas de un halo amarillo muy notorio.



Figura 17. Fruto de naranja afectado por CiLV.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.11 Cancrosis de lo cítricos (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) en fruto naranja

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.



Figura 18. Síntomas de *Xanthomonas axonopodis* en hojas y fruto de naranja.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.12 Antracnosis (*Gloeosporium limetticola*) en hoja y fruto limón

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.



Figura 19. Hojas y fruto de limón afectados por *Gloeosporium limetticola*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.13 Verugosis (*Sphaceloma sp*) en hoja y tallo Limón

En ambos lados de la hoja 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.



Figura 20. Hoja, fruto y tallo de limón afectadas por *Sphaceloma sp*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.14 Fumagina (*Capnodium citri*) en hoja y fruto de cítricos

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



Figura 21. Hojas de cítricos afectadas por *Capnodium citri*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.15 Fieltro o cuero (*Septobacidium pseudopedicellatum*) en tallo y hoja de lima

En hojas, ramas y frutos aparece un micelio de color 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.



Figura 22. Hojas de lima afectadas por *Septobacidium pseudopedicellatum*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.16 Verrugosis (*Cladosporium herbarum*) en hoja y fruto de maracuyá

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 verruga.



Figura 23. Hojas y frutos de maracuyá afectadas por *Cladosporium herbarum*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.17 Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc) en Fruto maracuyá

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.



Figura 24. Fruto de maracuyá afectado por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.18 Pudrición radicular (*Fusarium solani*) en raíz de maracuyá

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 preneclóticas. La enfermedad puede matar la planta.



Figura 25. Raíces de maracuyá afectadas por *Fusarium solani*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.19 Pudrición blanda (*Phytophthora palmivora* Butler) en fruto de papaya.

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 peciolo y tallos jóvenes causando caída prematura de frutos y hojas. En tallos maduros las lesiones se alargan y los debilitan causando caída de plantas cuando existe la presencia de fuertes vientos.



Figura 26. Frutos de papaya afectados por *Phytophthora palmivora*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.20 Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en fruto papaya

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.



Figura 27. Fruto de papaya afectado por *Colletotrichum gloeosporioides*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por el Autor.

5.2.21 Pudrición radicular (*Fusarium solani*) en raíz de papaya

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.



Figura 28. Raíces de papaya afectada por *Fusarium solani*.

Fuente: Fotografía tomada en el campo, por el Autor.

5.2.22 Viruela (*Asperosporium caricae*) en hoja de papaya

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. 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 si afecta la calidad.



Figura 29. Hojas de papaya afectadas por *Asperosporium caricae*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.2.23 Mancha blanca (*Corynespora cassicola* Weir) en hoja de papaya

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.



Figura 30. Hoja de papaya afectada por *Corynespora cassicola*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.3 Plagas

5.3.1 Pulgón negro (*Pentalonia nigronervosa* Coquerel) en Banano

Estos insecto viven formando colonias y succionan la savia de las plantas. Se los localiza en el pseudotallo, hojas jóvenes y frutos. Este insecto es vector del virus “Banana Bunchy Top Disease (BBTD, por sus siglas en ingles)



Figura 31. Pulgón negro (*Pentalonia nigronervosa*).

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por el Autor.

5.3.2 Picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) en plátano

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, las plantas fuertemente infectadas pueden caerse.



Figura 32. Picudo negro (*Cosmopolites sordidus*).

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.3.3 Picudo del palmito (*Rhynchophorus palmarum*) en palmito

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.



Figura 33. Picudo del palmito (*Rhynchophorus palmarum*).

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.3.4 Minador de cítricos (*Phyllocnistis citrella* Stainton)

La larva 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.



Figura 34. Síntomas y adulto del Minador de cítricos (*Phyllocnistis citrella* Stainton)

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.3.5 Ácaro de la leprosis (*Brevipalpus phoenicis*) en varios cultivos

Estos ácaros son vectores del virus que produce la 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.



Figura 35. Ácaro de la leprosis (*Brevipalpus phoenicis*).

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.3.6 Mosca de los frutos (*Anastrepha distincta* Greene) en palmito

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 valor comercial. Los frutos infestados llegan a caer de la planta.



Figura 36. Mosca de los frutos (*Anastrepha distincta* Greene).

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

5.3.7 Beauveria en picudo de palmito (*Beauveria bassiana* Vuill) en palmito

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

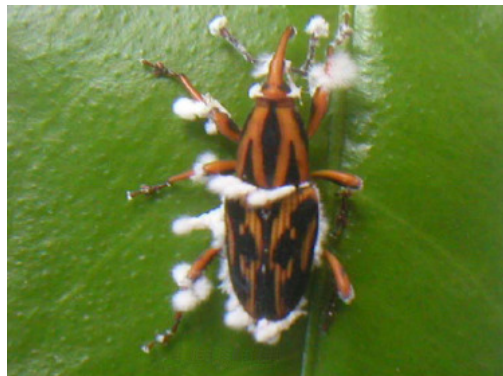


Figura 37. Adulto del picudo rayado (*Metamasius hemipterus*) atacado por *Beauveria bassiana*.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Fitopatología FAUSAC, por Reyes Donis, A. y el Autor.

VI. Conclusiones

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 investigación.

Dentro de las principales enfermedades encontradas tenemos: Mancha Johonston ocasionada por *Pyricularia grises*, Mancha de diamante (*Cercospora hayi*), Mancha cordana (*Cordana musase*), Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), Mancha foliar (*Cercospora sp*), Fumagina (*Fumago sp*), Mancha blanca (*Corynesporea cassicola*). Siendo la de mayor incidencia y daño *Colletotrichum gloeosporioides*, 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.

VII. Recomendaciones

Elaboración de un programa de contingencia inmediato para el 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.

VIII. Bibliografía

1. Agrios, GN. 1986. Fitopatología. Trad. Manuel Guzmán. México. Limusa. 755 p.
2. Barnett, HL; Hunter, BB. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. New York, Estados Unidos de América. Macmillan. 218 p.
3. BASF, GR. 1983. Plant diseases print film handbook. Germany. 190 films.
4. Carbajal Segura, EA. 1992. Diagnóstico de las condiciones socio-económicas y geográfico-naturales del Centro Urbano y líneas 4 y 5 del parcelamiento, Cuyuta, Masagua, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 42 p.
5. Cifuentes, ED; Alfaro Ortiz, ER. 2004. Planificación del uso de la tierra del centro experimental ICTA Cuyuta, Masagua, Escuintla (en línea). Consultado 3 nov 2008. Disponible en: <http://www.icta.gob.gt/fpdf/infop/suelos/planificacion%20uso%20de%20tierra.pdf>
6. Commonwealth Mycological Institute, UK 1987. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Set 1-92 (no. 1-920).
7. Ellis, MB. 1976. More dematiaceous hyphomycetes. Kew, Surrey, England. CAB. Commonwealth Mycological Institute. 197-204 p.
8. French, E; Hebert, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, IICA. 290 p.
9. Gallo, D; Nakano, O; Neto, SS; Carvalho, RPL; Casadei de Baptista, G; Berti Filho, E; Parra, JRP; Zucchi, RA; Alves, SB; Vendramin, JD; Marchini, LC; Lopes, JRS; Omoto, C. 2002. Entomología agrícola. FEALQ SP-Brasil 10:919 p.
10. Castaño Zapata, J. 1997. Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias y nematodos fitopógenos. Madrid. España, Ronald press. 485 p.
11. Matta, G. 1984. Diagnóstico general del parcelamiento Cuyuta, Masagua, Escuintla. Tesis Ing. Agr. Guatemala. USAC. 13 p.
12. Mont Koc, R; Fernández Northcote, E. 1986. Fitopatología agrícola: enfermedades bacterianas y fungosas. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Departamento de Sanidad Vegetal - Sección Fitopatología. 229 p.
13. Nelson, PE; Toussoun, TA and Marasas, WFO. 1983. Fusarium species: an illustrated manual for identification. Estados Unidos de América. The Pennsylvania State University Press. 193 p.
14. Quiñones, J. 2006. Sector agrícola del ICTA-CISUR, Cuyuta, Masagua, Escuintla (entrevista). Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola.

CAPÍTULO II. INVESTIGACIÓN

Caracterización patológica y diagnóstico molecular de cinco cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, aisladas de aguacate y anona y evaluación de protección cruzada como alternativa para manejo postcosecha en la estación ICTA-CISUR-Cuyuta, Masagua, Escuintla

Pathological characterization and molecular diagnostic of five strains of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc., isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) and annona (*Annona sp.*) and its evaluation of crossed protection as an alternative for postharvest management at the experimental station ICTA-CISUR-Cuyuta, Masagua, Escuintla.

I. Presentación

El aguacate y la anona son frutales de 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 activación de la industria postcosecha (Granados Friely, J.C., 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* (Penz) Penz & Sacc, anamorfo de *Glomerella cingulata*, misma que provoca grandes pérdidas, ya que lo afecta en cualquier etapa de desarrollo. (Reyes-Amado, C. y Morales-García, L., 2002)

Aunque la antracnosis puede ser causada por varias especies, *C. gloeosporioides* es la de mayor importancia económica dado que afecta un amplio intervalo de hospederos en los trópicos y subtrópicos (Manners *et al.*, 1993; Freeman, 2000). La investigación consistió en confirmar la patogenicidad e infección cruzada de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas en hojas, flores y frutos de las plantaciones de aguacate y anona 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 la amplificación de la región ITS, se utilizó 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 (Álvarez, E., *et al*, 2004). Este análisis confirma que se trata del hongo *C. gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc.

La caracterización de las cepas de *C. gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc implica la integración de características ecológicas, morfológicas y moleculares, pruebas de patogenicidad e infección cruzada, ya que muestra alta variabilidad morfológica (Sutton, 1980). A pesar de los daños asociados a la antracnosis en aguacate y anona, se han realizado pocos estudios sobre patogenicidad e infección cruzada, este es uno de los primeros estudios de este tipo realizado en la Costa Sur de Guatemala, el mayor conocimiento de *C. gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc contribuirá a la búsqueda de

alternativas para el manejo y control de la ocurrencia del inóculo de *C. gloeosporioides*, principalmente en la etapa de la postcosecha.

II. Marco conceptual

2.1 Antracnosis

2.1.1 Descripción

La Antracnosis puede ser causada por varias especies, *Colletotrichum gloeosporioides* es la de mayor importancia económica dado que afecta un amplio intervalo de hospederos en los trópicos y subtrópicos (Manners *et al*, 1993; Freeman, 2000) y especialmente como la causa de problemas pre y postcosecha. La habilidad del hongo para causar infecciones latentes lo ubica entre los patógenos más importantes en postcosecha (Rodríguez, 2007).

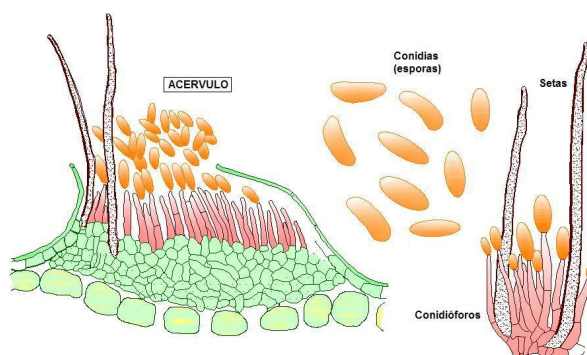


Figura 38. Acérvulo de *Colletotrichum*.

Fuente: Barnett *et al.*, 1999.

El hongo forma micelio blanco-grisáceo que puede variar a verde o negro, las conidias se desarrollan en hifas solitarias y en acérvulos y tiene la capacidad de producir peritecios de *Glomerella sp.* Las hifas son septadas, los conidios pueden variar en forma y tamaño (Monterroso, D)².

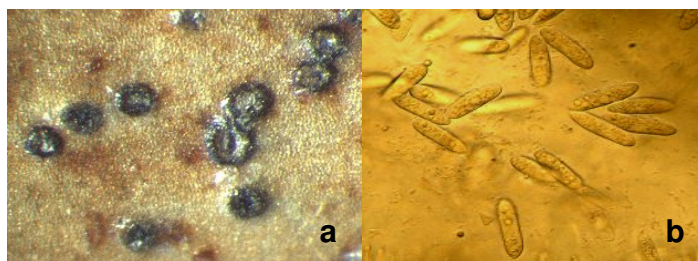


Figura 39. *Colletotrichum gloeosporioides*. a) Acérvulos y b) Conidias.

Fuente: Rosales Meda, L. 2007

² Comunicación personal Dr. en CC. Fitopatólogo, Prof. Titular, FAUSAC.

2.1.2 Clasificación Taxonómica

Según NCBI, 2008 (National Center for Biotechnology Information).

Caracterización Molecular por ITS.

Dominio: Eucariota
 Reino: Fungi
 Phylum: Ascomycota
 Subphylum: Pezizomycotina
 Clase: Sordariomycetes
 Subclase: Sordariomycetes incertae sedis
 Orden: Phyllachorales
 Familia: Phyllachoraceae mitospóricos
 Género: *Colletotrichum* (Estado Anamorfo)
 Glomerella (Estado Teleomorfo)

La Antracnosis es causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., que en su forma sexual corresponde a *Glomerella cingulata* (Ston) Spauld & Scherenk. Se caracteriza porque presenta conidias hialinas, unicelulares, ovoides u oblongas, ubicadas en una estructura llamada acérvulo. Estos cuerpos son en forma de disco, cerosos, sub-epidermales y típicamente oscuros. Además de los conidióforos y conidias, presentan setas en el borde del acérvulo y conidióforos (Dickman, M. B., 2006).

Su distribución es mundial y actualmente el taxón se considera constituido por 39 especies (según Sutton, 1992, citado por Rodríguez) entre las que se encuentran tanto saprófitas como parásitas. Las especies patógenas causan serias pérdidas en un amplio número de plantas cultivadas entre las que se encuentran frutales, cereales, pastos, leguminosas y cultivos perennes en regiones tropicales y subtropicales. Los síntomas de ésta enfermedad son frecuentemente una lesión denominada antracnosis, pudiendo lesionar la mayor parte de la planta. Al menos tres distintas especies de *Colletotrichum* se han asociado comúnmente con las plantas de café: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. kahawae* (Waller *et al.*, 1993).

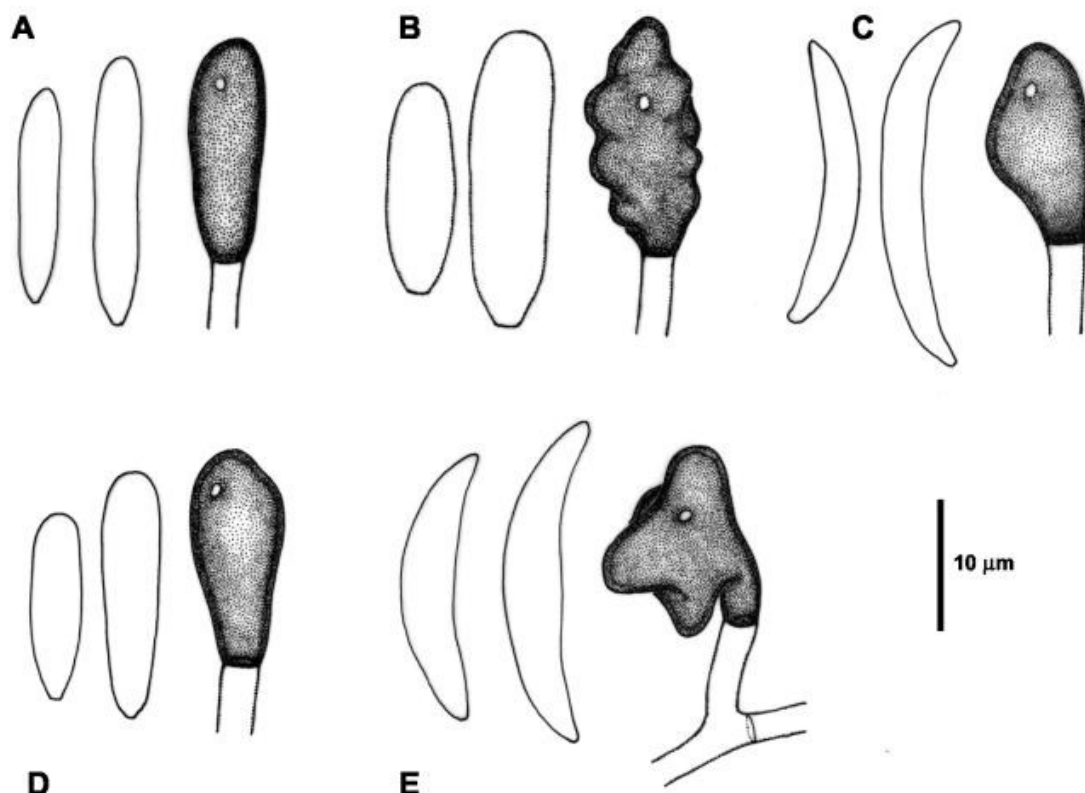


Figura 40. Conidias y apresorios de especies de *Colletotrichum* de interés fitopatológico. (A) *C. coccodes*; (B) *C. crassipes*; (C) *C. dematium*; (D) *C. gloeosporioides*; (E) *C. graminicola*.
Fuente: J. Clin. Microbiol. 2004. American Society for Microbiology.

Tabla 2. Características morfológicas más importantes para separar cinco especies de *Colletotrichum* interés fitopatológica.

Especies	Esclerocio	Apresorio	Conidia
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Presente (globosa)	Margen entero	Heterosexual; fusiforme; disminuye abruptamente a cada extremo; 16-22 a 3-4 µm.
<i>Colletotrichum crassipes</i>	Ausente	Margen crenado o profundamente lobuladas	Heterosexual; cilíndrica; ápice obtuso; base truncada; 11-20 a 6-8 µm.
<i>Colletotrichum dematium</i>	Presente (Cónico)	Margen entero o ligeramente irregular lobulado	Falcada; fusiforme; disminuye gradualmente a cada extremo; 19-25 a 2.5-3.5 µm.
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ausente	Margen entero; algunas veces lobulado	Heterosexual; cilíndrica; ápice obtuso; base truncada; 6-25 a 4-6 µm.
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Presente (irregular)	Margen muy irregular	Falcada; fusiforme; disminuye gradualmente en el vértice y la base; 24-28 a 4-6 µm.

Fuente: J. Clin. Microbiol. 2004. American Society for Microbiology.

2.1.3 Síntomas

Los síntomas de esta enfermedad puede aparecer cuando los frutos se han desarrollado, pero con mayor frecuencia cuando se aproximan a la fase de madurez. La antracnosis es común en árboles que se encuentran dañados o debilitados por una fertilización inadecuada, por sequía, bajas temperaturas, por la aspersion, los insectos u otras enfermedades. Las manchas foliares ocasionadas por la antracnosis producen la muerte y deshidratación de los tejidos infectados, produciéndose pequeños acérvulos negros dispuestos en círculos concéntricos en las zonas necrosadas (Agrios, G., 2005).

La pudrición se inicia como pequeñas zonas de color café claro que se extienden con rapidez, toman la forma de un círculo y se hunden hasta un cierto grado en su parte central. La superficie de las manchas es lisa al principio y puede ser parda oscura a negra hasta que las manchas tengan un diámetro de 1 a 2 cm. A partir de ese momento aparecen numerosas estructuras en forma de cojín de las manchas y algunas de ellas se extienden hacia fuera en dirección del borde de las manchas. En anona la pudrición también invade el mesocarpio y forma un cono de tejido podrido y un tanto aguanoso que puede o no tener sabor amargo (Agrios, G., 2005).

2.1.4 Condiciones ambientales

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* se disemina a través de la película de agua originada por el rocío y lluvias poco intensas pero frecuentes; cuando el hongo infecta la inflorescencia impide la formación de los frutos. La infección durante los períodos húmedos está relacionada con la temperatura y duración del período.

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.

En el campo está establecido que la temperatura óptima para la germinación de las esporas del hongo oscila entre 22 y 32 °C con óptima de 25 °C (Dickman M. B., 2006).

2.1.5 Ciclo Patológico de *Colletotrichum gloeosporioides*

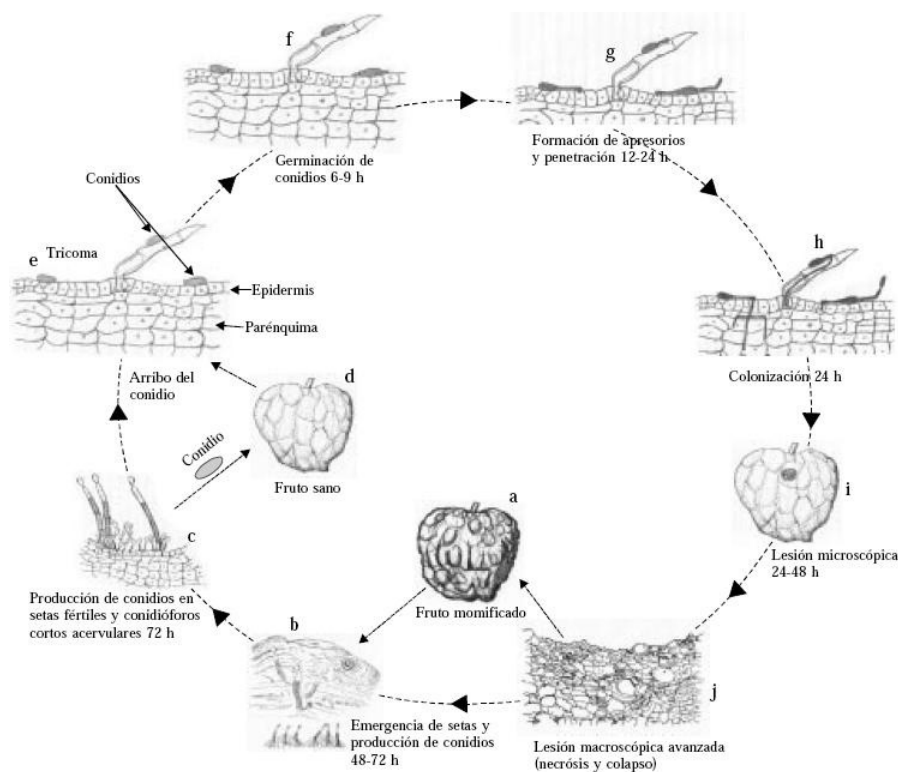


Figura 41. Ciclo de la enfermedad de la antracnosis en frutos de *Annona cherimola* Mill.)

Por *Colletotrichum fragariae*. Fuente principal de inóculo (a). Producción de conidias en setas (b) y acervulos (c). Adhesión de conidias en frutos sanos (d), en células epidermales y tricomas (e). Germinación de conidias 6-9 h (f), formación de apresorios y punta de penetración 12-24 h (g). Penetración directa por las células epidermales y tricomas (g). Colonización inter e intracelular de las células epidermales y basales de tricomas al mesocarpio 24 h (h). Aparición de lesiones 24-48 h (i-j). Formación de acervulos 48-72 h y producción de nueva fuente de inóculo 72 h (b-c) (2).
Fuente: Aramburu *et al.* 2005.

El hongo inverna en tallos, hojas y frutos enfermos de las plantas en forma de micelio o spora. Producen infecciones primarias y secundarias continuas durante toda la estación de crecimiento. 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 acervulos y conidias inmediatamente por debajo de la cutícula, la cual se rompe y libera las conidias para una vez más iniciar más infecciones (Agrios, G. N., 2005).

2.1.6 Manejo de Postcosecha

El mayor perjuicio económico de la antracnosis se evidencia en la fase de postcosecha, pues es allí donde se observa con mayor intensidad el daño y de una u otra forma se cuantifican las pérdidas ocasionadas. Evaluaciones relacionadas con caracterización de sistemas de producción indican que las pérdidas por antracnosis, en frutos cosechados son altas. Los daños en postcosecha ocurren por lo siguiente:

- Alta presión de enfermedad en el campo
- Una mala selección de frutos favoreciendo la entrada de frutos enfermos en las cajas u otro tipo de empaque
- Presencia de infecciones quiescentes o latentes provenientes del campo, que sólo se hacen evidentes cuando los frutos maduran y bajo condiciones de humedad y altas temperaturas de almacenamiento (Dickman, 2006).

2.2 Estrategias de penetración de *Colletotrichum*

El proceso físico de colonización de *Colletotrichum* es similar en muchas especies. Después de que la espora se adhiere al tejido del hospedante, esta forma un tubo germinativo que da origen a una estructura de infección llamada apresorio, de la cual emerge una estructura denominada “clavija de penetración”, que permite el paso directo a la cutícula, (Diéguez *et al*, 2005; Timmer *et al*, 2005; Zulficar *et al*, 1996; Bailey & Jeger, 1992) aunque también hay reportes de penetración indirecta a través de estomas o heridas sin formar apresorios, como el caso de *C. acutatum* en cítricos, el cual penetra los pétalos de flores sin la formación de apresorio (Zulficar *et al*, 1996; Bailey & Jeger, 1992). Después de la penetración del hongo, ocurren diferentes estrategias de colonización de los tejidos:

2.2.1 Penetración intracelular hemibiotrófica

Se establece una infección inicial a través de una breve fase biotrófica, asociada con una hifa primaria intracelular, convirtiéndose después en una fase necrotrófica destructiva asociada con una hifa secundaria angosta, la cual se ramifica a través del tejido del hospedante. En especies que adoptan esta estrategia la fase biotrófica inicial puede variar en cuanto a duración desde menos de 24 horas hasta 3 días. La fase inicial

biotrófica es seguida por una fase necrotrófica, la cual comienza con la aparición de hifas secundarias más angostas. Esta hifa se ramifica a través del tejido del hospedante inter e intracelularmente, muriendo rápidamente las células del hospedante debido a la degradación de la pared celular por parte de las enzimas producidas por el hongo (Diéguez *et al*, 2005; Timmer *et al*, 2005; Wharton & Diéguez, 2004; Zulficar *et al*, 1996).

2.2.2 Penetración necrotrófica intramural, subcuticular

Una vez penetrada la cutícula, el patógeno no entra inmediatamente dentro del lumen celular, sino que se desarrolla debajo de la cutícula, entre la pared periclinal y anticlinal de las células epidermales. No es claro si las células del hospedante permanecen vivas, pero los síntomas solo aparecen hasta 24 horas después de la penetración. Después del breve período asintomático, el hongo comienza a expandirse rápidamente a través del tejido del hospedante intra e intercelularmente, matando las células vegetales y degradando las paredes celulares. El patógeno es favorecido por las lluvias, alta humedad ambiental y temperatura óptima para su desarrollo de 20°C, con un menor desarrollo a 27°C y un escaso desarrollo a los 5°C, 10°C y 30°C. La humedad en forma de salpicaduras de lluvia y agua corriente ayuda a la distribución y deseminación de conidias de *Colletotrichum* sobre la misma planta o de una planta a otra (Diéguez *et al*, 2005; Timmer *et al*, 2005; Wharton & Diéguez, 2004; Zulficar *et al*, 1996; Agostini *et al*, 1992).

En el caso de muchos frutales, pueden ocurrir otras estrategias de infección. Con *C. acutatum*, las interacciones pueden ser intracelular hemibiotrófica cuando infecta frutos maduros de cultivares susceptibles o necrotrófica intramural sub-cuticular cuando infecta frutos de cultivares resistentes (Timmer *et al*, 2005; Wharton & Diéguez, 2004)

Según Lenne y Parbery (1976) citado por Rodríguez 2007, durante un estudio comparativo de germinación y modelos de infección en especies de *Colletotrichum*, se encontró que el apresorio aislado sobre la superficie de hojas se produjo en ausencia de tubos germinativos y conidias, pruebas preliminares sugirieron que no solo los apresorios fueron más durables que las esporas y los tubos germinativos sino que su formación fue fomentada por la presencia de bacterias.

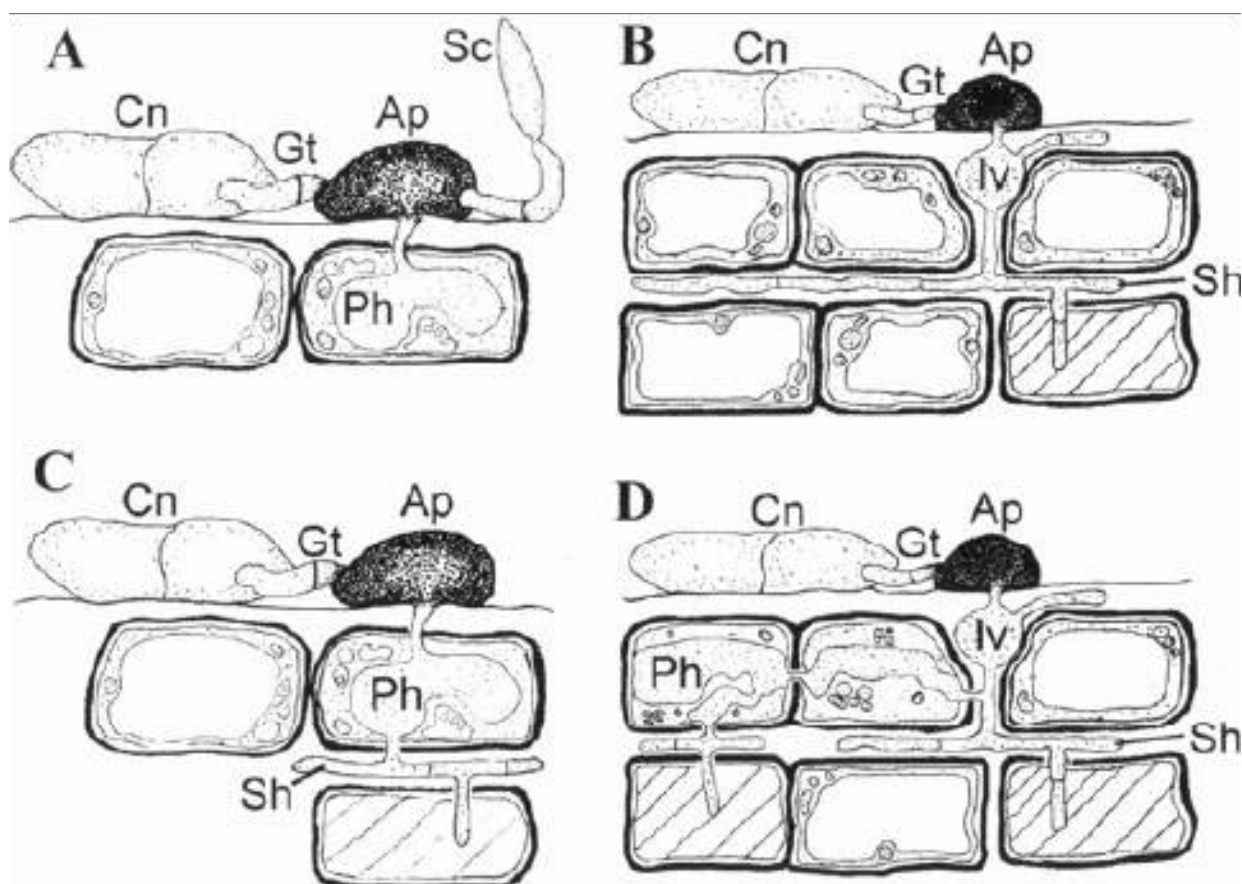


Figura 42. Diseño esquemático de diferentes interacciones de patógeno-hospedero y estrategias de infección de *Colletotrichum acutatum*.

A. Crecimiento biotrófico de *C. acutatum* con conidiación secundaria. Germinación de conidia para formar apresorio e infecciones inactivas. La conidia secundaria es formada después de la germinación del apresorio, (por ejemplo, predominantemente el ciclo de la enfermedad biotrófica en hojas de cítricos). **B. Subcuticular, necrotrófica intramural** con desarrollo hifal dentro del periclinal y las paredes anticlinales de las células epidermales del hospedero. Note que las paredes celulares del hospedero están hinchadas y lo más posible separadamente. (Por ejemplo, predominantemente en el ciclo de la enfermedad necrotrófica en fresa). **C. Interacción Hemibiotrófica** con infección visible y ancho de la hifa primaria dentro de la célula hospedera. Crecimiento inter-intracelular de la hifa secundaria ilustrando la siguiente fase necrotrófica. (Por ejemplo, combinación de biotrófica y necrotrófica, pero principalmente el ciclo de la enfermedad biotrófica en arándano). **D. Hemibiotrófica y sub-cuticular**, desarrollo inter-intracelular de *C. acutatum* en almendra (por ejemplo, combinación de bio y necrotrófica, pero principalmente el ciclo de la enfermedad necrotrófica en hojas y frutas de almendra). **Cn** = conidia; **Gt** = tubo germinativo; **Ap** = apresorio; **Iv** = vesícula de infección; **Ph** = hifa principal; **Sh** = hifa secundaria; **Sc** = conidia secundaria. La muerte de las células del hospedero, están indicadas con líneas diagonales.

Fuente: Adaskaveg, J. E. 1997.

Con relación a las estructuras de defensa (Agrios, 2005), incluyen cambios morfológicos en la pared celular o cambios derivados de ella cuando la célula es invadida por el patógeno. En algunos casos, las puntas de las hifas de los hongos que penetran una pared celular y crecen hacia el lumen celular son rodeadas por materiales celulósicos (de calosa) que después se saturan de sustancias fenólicas y forman un vaina o “lignitubérculo” en torno a la hifa (ver figura 43).

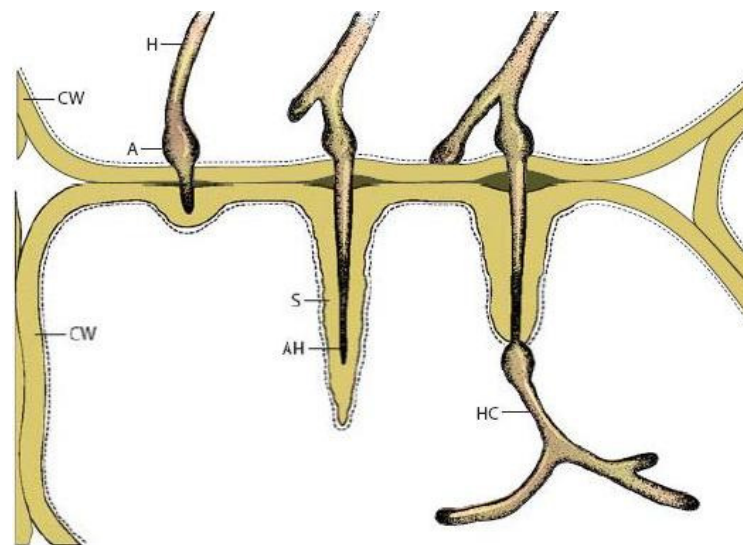


Figura 43. Formación de una cubierta protectora en torno a una hifa (**H**) que perfora la pared celular (**CW**). **A**, apresorio; **AH**, hifa penetrante aún encerrada en la cubierta; **HC**, hifa en el citoplasma; **S**, cubierta protectora.
Fuente: Agrios, G. 2005.

2.3 Métodos e identificación de *Colletotrichum*

Los métodos tradicionales para la diferencia entre especies de *Colletotrichum* se han basado principalmente en la morfología, analizando características tales como tamaño y forma de las conidias, color de la colonia, presencia o ausencia de setas y la existencia del teleomorfo *G. cingulata*. Sin embargo, a las influencias medioambientales en la estabilidad de las características morfológicas y la existencia de formas intermedias, estos criterios no son siempre los más confiables para la diferenciación de las especies de *Colletotrichum*. La Reacción en Cadena de La Polimerasa (PCR), al usar cebadores (primer) que se anidan a secuencias específicas, es una técnica molecular rápida y confiable para diferencias entre especies del complejo de *Colletotrichum*. (Freeman & Katan, 1997)

La aplicación de los marcadores moleculares en la taxonomía de los hongos promete aclarar las relaciones entre los distintos taxones que se encuentran poco separados a causa de los estudios morfológicos. Esto es de especial importancia debido a que con esto se puede entender la identidad y complejidad genética de una población de patógenos que afectan un huésped en particular y asimismo es esencial para formular estrategias efectivas de manejo de enfermedades (Bailey & Jeger, 1992).

2.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en Ingles)

La reacción de polimerización en cadena o PCR (Polymerase Chain Reaction), es una tecnología que se utiliza para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo. Esta tecnología se ha venido utilizando con bastante éxito desde que fue patentada 1985 y se ha empleado en diferentes campos del conocimiento, tales como la medicina, taxonomía, biología, agronomía, área forense y criminalística, principalmente. Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadoras llamadas “**primers**”, una enzima ADN polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); un amortiguador apropiado y un equipo llamado “termociclador” que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado. La PCR consiste en tres pasos esenciales: el primero es la **desnaturalización** y sirve para separar mediante temperatura (94°C) la molécula doble de ADN a cadenas sencillas, que servirán como moldes para la síntesis del (o los) fragmentos respectivo. En el segundo paso, la temperatura se reduce para permitir el **alineamiento** (o reconocimiento) de las moléculas iniciadoras a la secuencia blanco del ADN molde. Las moléculas iniciadoras pueden variar en longitud, composición de bases nitrogenadas y especificidad para parearse con la secuencia blanco y dependiendo de esto, la temperatura de alineamiento puede variar desde 25°C a 65°C. En el tercero, se lleva a cabo el **alargamiento** o **extensión** de la molécula iniciadora mediante la enzima ADN polimerasa a 72°C. Lo más recomendable es que la ADN polimerasa seleccionada tolere la temperatura de desnaturalización y se mantenga activa durante el número de ciclos que se requieran; por ejemplo, en muchas investigaciones se utiliza la ADN polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, debido a que tolera la temperatura de desnaturalización sin alterar su función de polimerización. Estos 3 pasos (ciclos) se repiten en el termociclador, permitiendo obtener de manera exponencial el fragmento o fragmentos discretos sintetizados a partir del molde de ADN; por ejemplo, en una reacción de 30 a 35 ciclos, se acumularan alrededor de 106 a 108 moléculas de ADN (ver Figura 44), estas secuencias amplificadas (sintetizadas de *novo*), pueden ser visualizadas en un gel de agarosa con técnicas de tinción convencionales (Valadez *et al*, 2000).

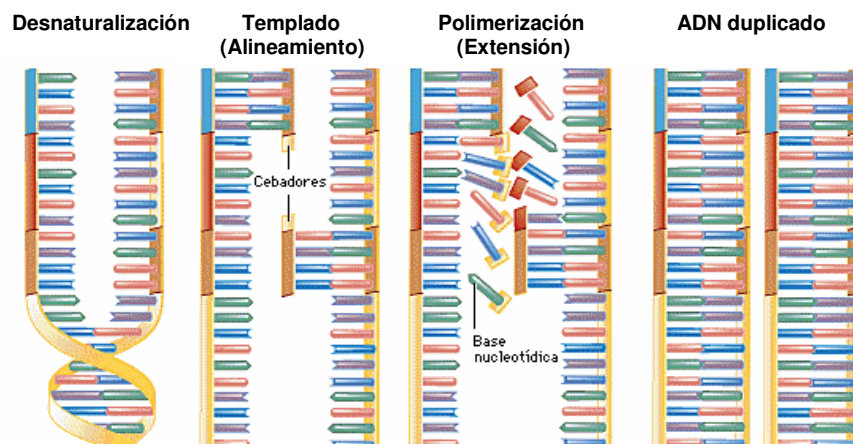


Figura 44. Esquematización del proceso de PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utiliza una enzima llamada polimerasa para multiplicar rápidamente un pequeño fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN), una molécula de doble cadena en forma de escalera que transporta el material hereditario en todos los seres vivos. Cada ciclo de PCR consta de tres fases. En la primera, llamada desnaturalización, se calienta el ADN para separar las dos cadenas que lo forman. En la segunda, llamada templado, la temperatura de la mezcla se rebaja para que los cebadores o fragmentos iniciadores del ADN se enlacen con las cadenas separadas de esta molécula. En la tercera o polimerización se eleva de nuevo la temperatura para que la enzima polimerasa copie rápidamente el ADN. En cada ciclo de PCR se duplica todo el ADN presente en la reacción, de manera que en unas pocas horas se obtienen más de mil millones de copias de un solo fragmento.

Fuente: Coleman, WB y Tsongalis, GJ (2006)

Una PCR tiene tres fases: exponencial, lineal y plateau. La fase exponencial es la que ocurre primero en la PCR, en la cual el producto incrementa exponencialmente cuando los reactivos no sean limitantes. La fase lineal se caracteriza por un incremento lineal en el producto a medida que los reactivos de la PCR se vuelven limitantes. La PCR eventualmente alcanzará la fase de plateau durante los últimos ciclos y la cantidad de producto no cambiará debido a que varios reactivos se han agotado (Yuan *et al*, 2006).

2.3.2 Espaciadores de Transcripción Interna (ITS, por sus siglas en Inglés)

El ribosoma de los eucariotas posee dos subunidades de ADN Ribosomal (rADN o DNAr siglas en inglés) con diferentes gradientes de sedimentación: 40S y 60S, el cual está codificado por tres genes, la subunidad grande (28S), la subunidad pequeña (18S) y el gen 5.8S, separados por las regiones de los 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 (Atkins & Clark, 2004; Cruz, 2003). La región ITS es quizá ahora el fragmento de ADN más secuenciado en hongos. Ha sido muy útil para estudios de sistemática molecular al nivel de especie y aún dentro de especies (ej., para identificar razas geográficas) (Duke University, [en línea]).

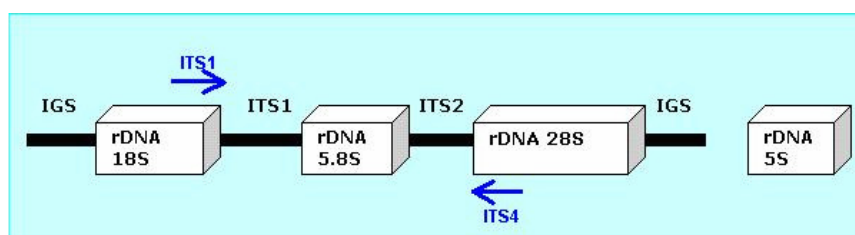


Figura 45. Unidad repetitiva de los rADN en el proceso de amplificación del ITS1 e ITS4.

Haciendo uso de dos cebadores, partidores o “primers” específicos (que son oligonucleótidos que inician la síntesis de ADN *in vitro*), llamados ITS1 e ITS4 (marcados en color azul) se puede amplificar la región comprendida entre ITS1, 5.8S rADN e ITS2, la cual varía en longitud, dependiendo de la especie.

Fuente: O'Donnell, K. 1992.

2.4 *Colletotrichum* en el cultivo de Anona

Según Castro (2007), los frutos presentan pequeñas manchas, de color marrón oscuro que pueden coalescer. Sobre las lesiones se pueden observar puntos negros formando círculos concéntricos. Cuando hay exceso de humedad se forman masas de color rosado que corresponden a las esporas del hongo. Un fruto con avanzado estado de antracnosis presenta agrietamientos que se proyectan hasta la pulpa, y favorece la entrada de otros hongos afectando por lo tanto la calidad de la misma. Cuando hay ataque de un insecto antes de la entrada de antracnosis, el fruto queda momificado en el árbol (Ver figura 46a.)



Figura 46. Síntomas de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc)

a) Fruto momificado, b) Inicios de la infección

Fuente: Castro *et al*, 2007

La diseminación de la enfermedad es favorecida por la alta humedad, causada ya sea por los excesos de lluvias o de rocío. El hongo sobrevive en tejidos afectados, como hojas, ramas, ramitas, frutos momificados (Castro *et al*, 2007).

2.5 *Colletotrichum* en el cultivo de Aguacate

La Antracnosis en el cultivo de aguacate es causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. Afecta el fruto después de cosechado, provocando manchas grandes de color marrón oscuro y la pudrición de la pulpa (Rondón, G., 1991).

Crane, J. (1990) considera que esta infección es importante sólo en los frutos. Las infecciones se producen en lesiones causadas por otros organismos como la roña y la mancha de *Cercospora*, o heridas causadas por agentes mecánicos. El hongo afecta principalmente a frutos maduros, ocasionando la pudrición de la misma. Las lesiones comienzan como manchas circulares de color marrón o negro las cuales se agrandan, hunden y se rajan.

El control exitoso de las enfermedades de las hojas y frutos producidas por hongos requiere que todas las partes del árbol susceptibles sean cubiertas con un fungicida antes de que la infección ocurra. Las fumigaciones aplicadas después de la infección (la cual ocurre usualmente varios días antes de que los síntomas sean detectados) tienen frecuentemente poco o ningún efecto en el desarrollo de la enfermedad. Las fumigaciones deben repetirse a medida que nuevos tejidos se produzcan por el crecimiento normal y que los residuos del fungicida desaparezcan debido a condiciones ambientales. Un programa exitoso depende de: (1) el uso de las cantidades correctas del fungicida y los agentes suplementarios recomendados; (2) aplicar el fungicida en el momento apropiado, antes de que ocurran las infecciones; (3) tratamiento de todas las partes del árbol susceptibles a la infección (Crane *et al*, 1990).

2.6 Infección cruzada

El potencial de la infección cruzada ha sido reportada entre diferentes especies de *Colletotrichum* y genotipos de *C. gloeosporioides* sobre variantes tropicales, subtropicales y templadas. Por ejemplo, aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* causan los mismos síntomas de enfermedad y son visualmente indistinguibles cuando se inoculan en pera (Freeman *et al*, 1998). Por otro lado, en siete aislamientos de *C. gloeosporioides* de frutas tropicales también se realizó la infección cruzada alternando las hojas y los frutos, y el éxito de la infección pareció depender de la densidad del inóculo (Freeman *et al*, 1998; Alahakoon *et al*, 1994).

2.7 Resistencia inducida

Existen muchos ejemplos en los que las plantas infectadas con un patógeno se vuelven más resistentes a una infección subsecuente causada por otro patógeno, asimismo, de plantas que se vuelven resistentes a un cierto patógeno si son inoculadas con el mismo patógeno en una etapa temprana de su crecimiento, durante la cual son resistentes al mismo. Sin embargo, también existen muchos ejemplos de plantas que se vuelven más susceptibles a un patógeno, si ya han sido previamente infectadas por otro patógeno (Agrios, GN. 2005).

Las plantas presentan mecanismos de resistencia ante una enfermedad como la síntesis de fitoalexinas y peróxido de hidrógeno, entre otros compuestos. Estas sustancias químicas actúan localmente en el sitio de infección, inhiben el desarrollo del patógeno y producen signos de inmunidad. Éstos se originan en el área enferma de la planta y se transportan a lo largo de la misma para sensibilizarlas y activar los mecanismos de resistencia para que actúen rápidamente cuando ocurra otra infección del mismo patógeno. La capacidad para sintetizar compuestos como las fitoalexinas y los signos de inmunidad residen en la célula situada en el punto de infección y posteriormente se pueden activar sistemáticamente en las células de tejidos alejados, adquiriendo la planta una inmunidad fisiológica (Agrios, GN. 2005; Nuckles y Kuc, 1998; Soliveri *et al*, 2003).

La resistencia inducida en las plantas aparece después de que han sido preinoculadas con agentes bióticos o previamente tratados con varios agentes químicos o físicos. Se ha inducido resistencia en una amplia gama de vegetales ante el ataque de hongos, bacterias, virus e incluso insectos. La resistencia inducida no es específica debido a que, sin importar el tipo de agente o patógeno utilizado como inductor, el nivel de resistencia aumenta ante varios patógenos (Agrios, GN. 2005).

2.8 Protección cruzada

El término protección cruzada se desarrolló y acuñó por la protección que brinda a una planta una variante no virulenta (síntomas atenuados) de un virus en contra de la infección provocada por otra variante del mismo virus que produce síntomas mucho más severos. Esto parece ser un fenómeno generalizado entre variantes de virus (Monterroso,

D. 2008)³. Su aplicación en el control de las enfermedades virales, ha mostrado cierto éxito en el caso de la protección cruzada de plantas de tomate con variantes atenuadas del virus del mosaico del tomate y, de cítricos con variantes atenuadas del virus de la tristeza de los cítricos. Sin embargo, la protección cruzada no ha logrado una aceptación generalizada debido a que no existen variantes atenuadas apropiadas, el método que se aplica a los cultivos del campo es laborioso ya que existe el riesgo de que ocurran mutaciones hacia nuevas variantes más virulentas, una doble infección y la diseminación hacia otros cultivos en los que la virulencia podría ser mayor (Agris, GN. 2005 y Aramburu *et al.* 2005).

³ Comunicación personal Dr. en CC, Fitopatólogo, Prof. Titular FAUSAC.

III. OBJETIVOS

3.1 General

1. Establecer la variabilidad del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. en los cultivos de aguacate y anona en condiciones del ICTA Cuyuta.

3.2 Específicos

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

IV. HIPÓTESIS

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. tiene una alta variabilidad morfológica y patológica, en aguacate y anona en condiciones del ICTA Cuyuta.

Las cepas del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, aisladas de aguacate y anona, pueden ser utilizadas en protección cruzada como alternativa de manejo postcosecha.

V. Metodología

5.1 Trabajo de Campo

5.1.1 Caracterización de síntomas y signos

Se realizó un recorrido en las plantaciones de Aguacate y Anona para observar la presencia de síntomas y signos de antracnosis en ramas, hojas, flores y frutos, con la ayuda de lupas o lentes de aumento. En cada cultivo se procedió a describir los síntomas *in situ* en cada uno de los órganos de las plantas con el propósito de corroborar los síntomas descritos.

5.1.2 Toma y traslado de material enfermo

Se colectaron muestras de material enfermo de hojas, flores y frutos con síntomas de antracnosis en los cultivos establecidos de aguacate y anona. El material enfermo se colocó en bolsas de plástico con algodón humedecido envueltas en papel periódico colocándolas debidamente identificadas en una hielera para ser transportadas al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía (FAUSAC).

5.2 Trabajo de Laboratorio

5.2.1 Caracterización de síntomas y signos

Del material proveniente del campo se procedió a observar bajo estereoscopio y se describieron los síntomas macro y microscópicos, tales como, cambios de coloración, presencia de halo, presencia de estructuras reproductivas, etc.

En hojas, flores y frutos los síntomas y signos de *Colletotrichum gloeosporioides* se observaron lesiones circulares e irregulares de colores negros, crema oscura con abundantes acérvulos.

5.2.2 Cámara húmeda

Las muestras vegetales recolectadas se colocaron en cámaras húmedas para favorecer el desarrollo de las estructuras reproductivas del hongo (*ver figura 11*), con la finalidad de poder aislarla. La cámara húmeda consistió en cajas de plástico transparente de 15 cm de alto, 40 cm de largo y 25 cm de ancho, agregando papel mayordomo parcialmente humedecida en el fondo de la caja, las hojas, ramas, flores y frutos se colocaron sobre cajas Petri para que no haga contacto directo con el papel mayordomo, y las muestras se dejaban de 2 a 3 días máximo.

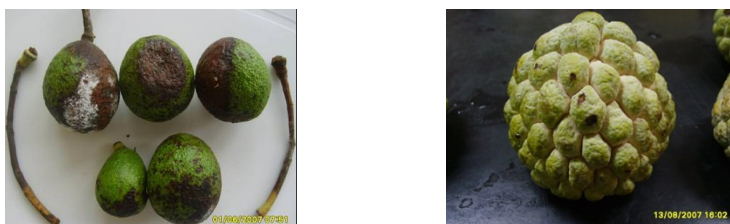


Figura 47. Frutos de aguacate y anona colocadas en cámara húmeda para la realización de aislamientos de *C. gloeosporioides*.

Fuente: Autor

Los materiales de aguacate y anona fueron colocadas en cámara húmeda para el desarrollo del patógeno y de este modo poder realizar montajes de las diferentes estructuras (Ver figura 12).

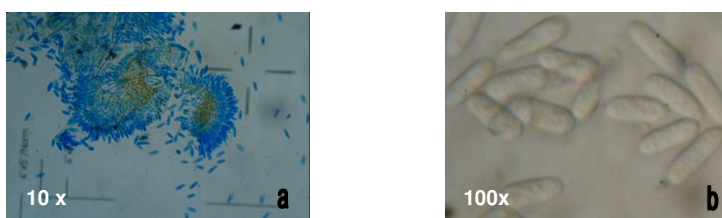


Figura 48. Montajes de *C. gloeosporioides* realizados en frutos de anona.
a. Masas conidiales. b. Conidias.

5.3 Obtención de aislamientos de *Colletotrichum*

5.3.1 Siembra en medio de cultivo

Fragmentos de material vegetal procedente del campo fueron desinfectados mediante la secuencia: alcohol al 70%, agua destilada, hipoclorito de sodio al 2%, agua destilada, alcohol al 70%, posteriormente otras dos etapas de agua destilada, con un intervalo de tiempo de un minuto en cada fase. Luego, cada fragmento se colocó en cajas Petri con medio Extracto Malta-Agar (EMA) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$; Para posteriormente, realizar la purificación y obtención de cultivos monospóricos.

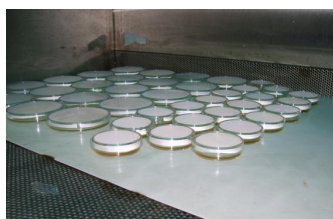


Figura 49. Cajas Petri con extracto malta-agar (EMA).

Fuente: Autor

Para la purificación, se extrajo 2ml de suspensión de cada muestra para realizar la siembra del hongo en medio EMA, y en agar-agua para obtener los cultivos monospóricos.

5.3.2 Incubación

Se procedió a la incubación de los medios de cultivos con su respectivo aislamiento de aguacate y anona en horno a 22 °C



Figura 50. Incubación de aislamientos.

Fuente: Autor

5.3.3 Obtención de cepas

Cada uno de los aislamientos realizados de hojas, flor y fruto corresponde a una cepa específica de *Colletotrichum gloeosporioides*. Tales cepas fueron denominadas por una clave asignada de la manera siguiente:

Tabla 3. Codificación de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*.

No.	Nombre de Cepa	Clave o codificación
1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado de hoja de anona cepa 1	CAHAnC ₁
2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado de fruto de anona cepa 2	CAFrAnC ₂
3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado de hoja de aguacate cepa 1	CAHAgC ₁
4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado de fruto de aguacate cepa 2	CAFIAgC ₂
5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> aislado de flor de aguacate cepa 3	CAFrAgC ₃

5.3.4 Caracterización *In vitro*

Se describieron las características morfológicas; como coloración de colonia, crecimiento, forma del cultivo, etc., se tomaron fotografías para tener un registro de cada uno. También se realizaron montajes para observar las características microscópicas de las conidias y de la presencia de la fase perfecta *in vitro*.

5.3.5 Cultivos monospóricos o monoconidial

La metodología empleada para la realización de los cultivos monospóricos (monoconidial) de las diferentes cepas de *C. gloeosporioides* aisladas de aguacate y anona fue de la manera siguiente: Se procedió a esterilizar todo el material a emplear y el agua fue desmineralizada, bi-destilada y auto-claveada. De los aislamientos obtenidos se

extrajo un acérvulo de la caja Petri y se introdujo en 10 ml de agua esterilizada contenida en un beacker, agitándolo constantemente para lograr el desprendimiento de las esporas, de esta suspensión se tomo 1 ml para incorporarla a otros 9 ml de agua esterilizada para obtener un suspensión mas diluida. De esta última suspensión se tomo 50µl con una pipeta Pasteur y se colocó en cajas de Petri con EMA, tratando de homogenizar bien la suspensión sobre el medio. Al cabo de 24 horas se comenzó a observar bajo el estereoscopio (4x) el crecimiento o germinación de esporas, de las cuales fueron extraídas individualmente y sembradas en cajas Petri con EMA. Obteniendo de esta manera los cultivos monospóricos de cada aislamiento de *C. gloeosporioides*.

5.4 Diagnóstico molecular

Mediante un análisis de las secuencias obtenidas a partir de definir de las cepas aisladas de aguacate y anona, si hay correspondencia de las especies de *C. gloeosporioides* identificadas morfológicamente y la identificación filogenético ITS, ya que esta permite la identificación de la especie, usando como marcador la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN molecular.

5.4.1 Multiplicación del micelio

- Preparación de Extracto Malta-Agua (EMA) para 14 cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*: Se depositó en un Erlen Meyer (matraz) 3 gramos de Malta, 2 gramos de Dextrosa más 200 ml de Agua destilada, se autoclaveó por 15 minutos y después se distribuyó en 14 frascos de compota con aproximadamente 10 ml.
- Se siembra pequeños fragmentos de micelio de cada cepa en los frascos de compota con medio EMA.
- Esperar que el micelio crezca dentro de los frascos de compota hasta que cubra la totalidad del medio, esto se da aproximadamente de 3 a 5 días de haber realizado la siembra.
- Cosechar el micelio en la campana, esto se hace extrayendo el micelio de los frascos de compota con el menor contenido de medio y colocarlos en pedazos de papel filtro estéril para eliminar el exceso de medio.
- Introducir el micelio a tubos eppendorf de 1.5 ml, tratando de dejarlo hasta el fondo y almacenarlo en el congelador a -20°C.

5.4.2 Liofilización del micelio

- Extraer los tubos eppendorf del congelador y colocarlos rápidamente en un ráquix o gradillas (circulares para 7 tubos eppendorf).
- Liofilizar en la cámara a 6×10^{-2} mb a -50°C .
- Extraer los tubos eppendorf contenidos en el ráquix y colocarlos en la campana para la extracción de ADN.

5.4.3 Procedimiento para la Extracción de ADN (Zolan y Pukkila, 1986)

- Inmediatamente de liofilizar el micelio, se comienza a triturar (pulverizar) el micelio dentro los tubos eppendorf con la ayuda de un pistilo (un pistilo por cepa) y después agregar 500 μl del buffer de extracción CTAB 2X
- Colocar los tubos eppendorf de nuevo en los ráquix para dejarlo en baño María a 65°C por 60 minutos, ya que esto puede ayudar a la extracción e hidratación de los ácidos nucleicos.
- Llevar los tubos a la campana para agregarle 500 μl de Fenol-Cloroformo-alcohol isoamyl en una relación de 1:24:1 a cada muestra. Agitar vigorosamente a mano hasta formar una emulsión.
- Centrifugar 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 remover la capa superior a un tubo eppendorf limpio y rotulado (evitar tomar material de la interfase, en este caso la capa de micelio formado). Desechar el contenido del tubo viejo como residuo orgánico.
- Re-extracción de muestras una segunda vez, usando ligeramente menos Fenol-cloroformo-alcohol isoamyl (1:24:1) (250 μl ; la mitad del usado la primera vez, agitar lentamente en forma horizontal). Esta vez habrá menos material emulsificado. Centrifugar y extraer cuidadosamente la capa superior a un tubo limpio y rotulado. (Si desea ADN extra-limpio repita el paso de extracción una tercera y aun una cuarta vez hasta que no haya material de interfase y la porción acuosa es nítida y clara) en cualquier caso sea cuidadoso de evitar cualquier interfase de material proteínico después de su extracción final- siempre es mejor dejar algo de la interfase para evitar la contaminación de proteínas.

- Agregar 250 μ l isopropanol frío, tapar e invertir mezclando. Para regular las mini preparaciones, Usted puede ver la precipitación de hebras blancas (ADN con la presencia de polisacáridos). Si se ve un precipitado visible, colectar el precipitado e inmediatamente centrifugar las muestras por 2 minutos. Si el precipitado no es observado inicialmente, entonces ponga sobre hielo (en el congelador a -20°C) por varios minutos o toda la noche. Esto debe sacar muchas otras cosas además de ADN. Colectar el precipitado centrifugando por 2 a 5 minutos.
- Después de centrifugar descartar (decantar) el alcohol sobrenadante y lavar la pelotita que queda (de 1 a 5 min) con 100 μ l de EtOH 80% frío. Remover el alcohol y secar la pelotita completamente en la campana a temperatura ambiente.
- Agregar 50 μ l EtOH 95% frío mas 25 μ l de Acetato de amonio, centrifugar por 2 minutos y decantar el sobrenadante.
- Lavar con 100 μ l de etanol al 95% por 1 minuto y decantar. En este proceso se secan los tubos eppendorf embrocados por 4 minutos, tratando de que la pelotita de ADN no se deslice.
- Agregar 25 μ l de Agua libre de nucleasa. Almacenar en el congelador a -20°C .

5.4.4 Electroforesis

Preparación de Gel de Agarosa 0.8%:

- Pesar 1.2 gramos Agarosa mas 150 ml de TAE 2X
- Mezclar ambos en un matras y calentar en intervalos de tiempo de 30 segundos en el microondas, esto para lograr una mejor homogenización de la solución.
- Enfriar la solución a $\pm 30^{\circ}\text{C}$ y agregarle la cantidad necesaria (15 μ l) de Bromuro de Etidio al 10%
- Verter la solución de agarosa en la celda de electroforesis, posteriormente agregar los 2 peines, esperar hasta que gelatinice y agregarle el TAE 2X suficiente hasta cubrir parcialmente el gel de agarosa. Extraer los 2 peines para que se rellenen de TAE 2X los espacios dejados por los dientes.
- Sacar los tubos eppendorf del congelador y descongelar, tratando de homogenizar la muestra de ADN y cargar 2 μ l de la misma con 3 μ l de azul de cada una de las cepas, esto se realizó sobre un pedazo de papel parafilm, luego introducirlo 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 lader mas 3 μl de azul.

- Se coloca 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 puede comprobar extrayendo el gel de agarosa conjuntamente con la cámara de sostén del mismo y colocando solamente el gel en el transluminador de rayos UV (GelDocMeg), en donde se podrá observar dicha banda de ADN.

5.4.5 Amplificación por PCR

- Se prepararon diluciones de ADN para obtener una concentración ≥ 100 picomoles para cada una de las muestras.
- La elaboración del Master Mix consistía en lo siguiente:

Tabla 4. Procedimiento para la elaboración de Master Mix

Reactivo	Cantidad	Nota
PCR Master Mix Gold	12.5 μl	23 μl de Master Mix por muestra de ADN
Primer 1 (ITS1)	02.5 μl	
Primer 2 (ITS4)	02.5 μl	
H2O libre de Nucleasa	05.5 μl	
TOTAL	23.0 μl	

- En un tubo eppendorf pequeño nuevo y rotulado agregar 23 μl Master Mix más 2 μl muestra de ADN diluido de cada cepa.
- Centrifugar por 15 segundos para deslizar toda la muestra al fondo del tubo.
- Colocar los tubos eppendorf en el termociclador (PCR) y correr el programa Rytas, el cual viene programado para amplificar un determinado segmento de ADN por 2:35 horas aproximadamente.
- Para verificar la amplificación correcta de ADN se volvió a preparar gel de agarosa. En las cepas que no se llevo a cabo la amplificación, se retornó a realizar de nuevo las diluciones hasta la obtención de la amplificación.

- Se usaron las condiciones estándares para la amplificación de ADN; 94°C por 3 minutos y 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 50°C por 0.5 minutos y 72°C por un minuto, enlazados entre si por 7 minutos a 72°C.

5.4.6 Sistema de Purificación Directa de ADN a Partir de Amplificaciones de PCR

- Se transfiera una alícuota de 100 µl de Direct Purification Buffer en un tubo eppendorf de 2 ml. Añadir el producto de PCR (en nuestro caso 42µl) agitar o Vortexé brevemente para mezclar. Se añade 1 ml de resina y agitar en el vortex brevemente 3 veces en el lapso de un minuto. Materiales que debe tener a la mano: -Isopropanol 80% grado reactivo (frío), Agua bidestilada libre de nucleasa y jeringas de 3 ml con Luer-Lok.
- Para cada producto de PCR prepare una mini columna Wizard. Remueva y deje a un lado el embolo de la jeringa de 3 ml. Una la mini columna a la jeringa a través de la rosca Luer-Lok. No apriete muy fuerte, porque se trasrosca. Pipeté la mezcla ADN/resina dentro de la jeringa. Inserte el émbolo lentamente y suavemente empuje para que la mezcla entre en la columna.
- Quite la jeringa de la mini columna, y remueva de nuevo el émbolo. Ponga de nuevo la jeringa a la mini columna. Pipeté 2 ml de isopropanol 80% para lavar la columna. Inserte otra vez en émbolo en la jeringa, y empuje suavemente el isopropanol a través de la mini columna para lavar el ADN.
- Remueva la jeringa de la mini columna y la trasfiere esta última a un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Centrifugue la mini columna por 2 minutos a 10,000 x g para secar la resina.
- Transfiera la mini columna a un nuevo tubo de micro centrífuga. Aplique 50 µl de agua bidestilada libre de nucleasa o Buffer TE a la mini columna y deje reposar por 1 minuto (el ADN permanecerá en la mini columna hasta por 30 minutos). Centrifugue la mini columna por 20 segundos a 10,000 x g para sacar (elute) el ADN.
- Remueva y descarte la mini columna. El ADN purificado puede ser almacenado en el tubo de micro centrífuga de 4 a -20°C.

5.4.7 Secuenciación de las cepas de *Colletotrichum*

- La secuenciación de las cepas de *Colletotrichum* se realizaron en Corea a través de una solicitud de secuenciación que se obtiene en la página de macrogen

<http://www.macrogen.com> y posteriormente se realizó el trámite de papeles para el envío de las muestras purificadas de ADN contenidas en los tubos eppendorf.

- A los 4 días de haber enviado las muestras ya se contaba con los resultados de secuenciación, las cuales para obtenerlas se tenían que bajarlas de la página de Macrogen.
- Para verificar la secuenciación se alinearon las secuencias obtenidas usando el oligonucleotido ITS1 e ITS4 en el programa Blast; posteriormente se usó el programa Chromas para editar la secuencias ITS1; en el caso de fuera necesario cambiar o agregar alguna base que no estuviera incluida. La identificación de la especie de *C. gloeosporioides* se logró al ingresar las secuencias editadas en el programa BLASTn del GenBank en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) el cual las alinea y compara con la base de datos y nos muestra las secuencias similares a la nuestra. Tal similitud reflejará la similaridad de las especies con la nuestra.
- Como complemento al análisis de secuencias, se realizó la construcción de un árbol filogenético de las diferentes muestras de *C. gloeosporioides*, utilizando los programas MEGA 4 y TreeView.

Esta actividad se desarrolló en los laboratorios de biotecnología del Colegio de la Frontera Sur de México – ECOSUR, mediante un taller impartido por los doctores Graciela H. Palacios y Francisco Holguín Meléndez.

5.5 Pruebas de patogenicidad e infección cruzada

5.5.1 Protección de frutos de aguacate y anona en el campo

Los frutos de aguacate y anona se cubrieron con bolsas de papel manila, con el fin de protegerlos de cualquier contaminación y lograr frutos plenamente sanos para las pruebas de patogenicidad e infección cruzada.



Figura 51. Protección de frutos de anona para las pruebas de patogenicidad e infección cruzada.

Fuente: Autor

5.5.2 Pruebas de patogenicidad

Se recolectaron hojas y frutos sanos de Aguacate y Anona en el campo, y trasladados al laboratorio para su tratamiento con alcohol al 50% por 30 segundos, hipoclorito de sodio 1% por un minuto y lavados con agua esterilizada. La inoculación de las hojas y frutos de aguacate y anona fue realizado en condiciones de laboratorio. Todas las inoculaciones se realizaron con suspensión de esporas del hongo 1:10 para las pruebas de patogenicidad. Las inoculaciones se realizaron de la siguiente manera: De las suspensiones 1:10 se tomaron 50 microlitros con la Pipeta Pasteur posteriormente se colocaron en los frutos sanos mediante un segmento de papel filtro (1 cm de diámetro) para evitar el escurrimiento sobre la hoja o fruto. Se realizaron diferentes tipos de pruebas como por ejemplo: con y sin herida, mediante un comparador (testigo) donde solo se utilizó agua destilada estéril.

5.5.3 Pruebas de infección cruzada

Para las inoculaciones se utilizó la misma metodología de las pruebas de patogenicidad, la infección cruzada fue de la siguiente manera:

CAHAgC₁	<i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de aguacate	→en hoja de anona
CAFIAgC₂	<i>C. gloeosporioides</i> aislado en flor de aguacate	→en hoja de anona
CAFrAgC₃	<i>C. gloeosporioides</i> aislado fruto de aguacate	→en hoja de anona
CAHAgC₁	<i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de aguacate	→en fruto de anona
CAFIAgC₂	<i>C. gloeosporioides</i> aislado en flor de aguacate	→en fruto de anona
CAFrAgC₃	<i>C. gloeosporioides</i> aislado fruto de aguacate	→en fruto de anona
CAHAnC₁	<i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de anona	→en hoja de aguacate
CAFrAnC₂	<i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de anona	→en hoja de aguacate
CAHAnC₁	<i>C. gloeosporioides</i> aislado en hoja de anona	→en fruto de aguacate
CAFrAnC₂	<i>C. gloeosporioides</i> aislado en fruto de anona	→en fruto de aguacate

5.6 Pruebas de Protección cruzada

5.6.1 Prueba de protección cruzada en frutos aguacate

Prueba 1. Se inocularon en tres puntos del fruto sano con *Colletotrichum* aislado de anona sacado directamente de la caja de Petri y a las 72 horas se le inoculó el de aguacate extraído directamente de la caja Petri, los puntos de inoculación se trabajaron sin lesión.

Prueba 2. Se inocularon en tres puntos del fruto sano con *Colletotrichum* aislado de anona con una suspensión de esporas 1:10 y a las 72 horas se le inoculó el de aguacate con una suspensión 1:10, los puntos de inoculación se trabajaron sin lesión y utilizando círculos de papel mayordomo esterilizado en los puntos de referencia para evitar el escurrimiento del inóculo.

5.6.2 Prueba de protección cruzada en anona

Prueba 1. Se inocularon en tres puntos del fruto sano con *Colletotrichum* aislado de aguacate sacado directamente de la caja de Petri y a las 72 horas se le inoculó el de anona extraído directamente de la caja Petri, los puntos de inoculación se trabajaron sin lesión.

Prueba 2. Se inocularon en tres puntos del fruto sano con *Colletotrichum* aislado de aguacate con una suspensión de esporas 1:10 y a las 72 horas se le inoculó el de anona con una suspensión 1:10, los puntos de inoculación se trabajaron sin lesión y utilizando círculos de papel mayordomo esterilizado en los puntos de referencia para evitar el escurrimiento del inóculo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron tres aislamientos en el cultivo de aguacate (hoja, flor y fruto, respectivamente), mientras que en el cultivo de anona se obtuvieron dos cepas (hoja y fruto). La determinación de la especie se realizó mediante el diagnóstico molecular, bajo la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), como también, mediante el uso de claves taxonómicas de Barnett, *et al.*, las cuales se basan en características morfométricas y pictográficas que determinan a *C. gloeosporioides*.

6.1 Caracterización de Campo

6.1.1 Aguacate

a. Fruto

Manchas negras circulares, que se cubren de masas de esporas de color anaranjadas en el estado avanzado de la enfermedad. La pudrición de la fruta puede llegar a penetrar el mesocarpio e inducir una coloración parda y un olor rancio (fermento). Generalmente penetra por lesiones mecánicas o lesiones viejas causadas por *Cercospora*, tanto en las hojas como en los frutos, en vista que ataca a los frutos listos para cosechar provoca una ruptura de la cáscara.



Figura 52. Antracnosis en frutos de aguacate causada por *C. gloeosporioides*
Fuente: Autor

El hongo, dado que produce apresorios efectivos, tiene la capacidad de penetrar directamente (Adaskaveg, 1997; Aramburu *et al.*, 2005); sin embargo, en las condiciones del área en donde se realizó el estudio *C. gloeosporioides* en la mayoría de esporas penetró en lesiones mecánicas y también se vio invadiendo el tejido a partir de lesiones provocadas por *Cercospora spp.*

b. Hoja

El daño por *C. gloeosporioides* es mas evidente en las hojas maduras, ya que en las hojas jóvenes las lesiones son muy pequeñas o la infección es latente. Los síntomas mas comunes es la presencia de pequeñas manchas de color marrón en el has y envés, con el avance de la enfermedad se desarrollan anillos concéntricos en los cuales los acérvulos se hacen visibles principalmente en el has como pequeños puntos de color negro.



Figura 53. Mancha foliar en hojas de aguacate causada por *C. gloeosporioides*.

Fuente: Autor

c. Flores

Los daños en flores por *C. gloeosporioides* se caracterizan al inicio de la infección por manchas de color marrón oscuro, hasta provocar la caída de las mismas, estos daños son más frecuentes a raíz de los cambios en el clima y se agudizan en aquellos períodos caracterizados por lluvias abundantes seguidas por temperaturas altas. El daño en las flores se ubica en los nudos de la parte media e interna de la rama.

6.1.2 Anona

a. Flores y Frutos

El daño causado por *C. gloeosporioides* se manifiesta en las flores por lesiones de color marrón a negras y los frutos pueden ser dañados desde etapas muy tempranas de desarrollo, con manchas negras que los cubren rápidamente y provocan su caída. Reduciendo de este modo la producción y la calidad de los frutos.

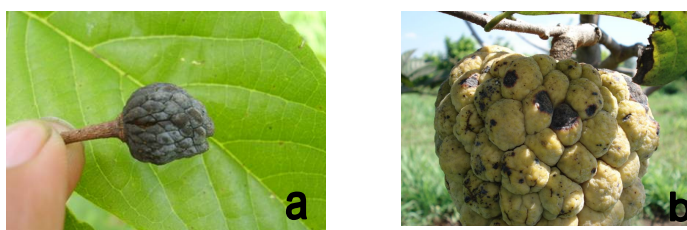


Figura 54. Daños en frutos de anona causado por *C. gloeosporioides*.

a. Momificación de fruto de anona causada por *C. gloeosporioides*. b. Antracnosis en fruto de anona con daños por *C. gloeosporioides*. Fuente: Autor

b. Hoja

Ataca preferentemente los tejidos jóvenes desde las hojas hasta los frutos. En las hojas, produce manchas negras en el ápice y deformaciones en los bordes.



Figura 55. Antracnosis en hojas de anona causada por *C. gloeosporioides*.
Fuente: Autor

En síntesis podemos decir que *C. gloeosporioides* produce acérvulos en el tejido de tallos, hojas, flores y frutos de aguacate y anona. En estos acérvulos se forman masas de conidias llamadas conidiosomas de color rosado. Las conidias se originan a partir de conidióforos cortos. Las conidias son hialinas y cilíndricas de extremos ovoides.

6.2 Aislamientos de cepas de *C. gloeosporioides*

De los aislamientos realizados de tallos, hojas, flores y frutos de aguacate y anona se realizaron cultivos monospóricos para la realización de las pruebas moleculares y se conservaron 15 copias de cada uno en viales.

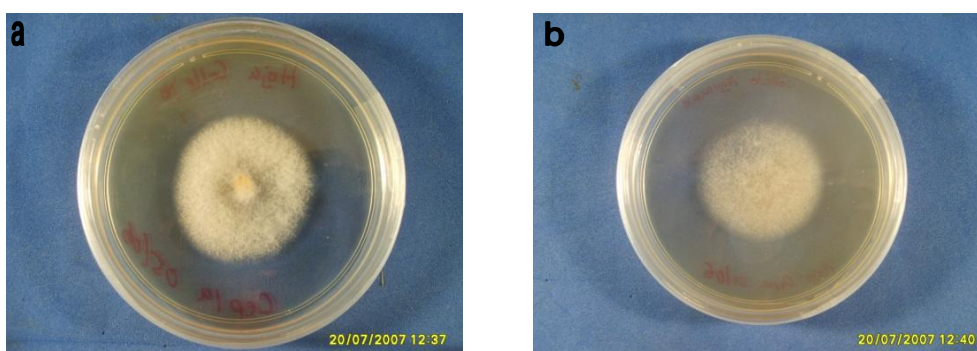


Figura 56. Desarrollo monospórico de *C. gloeosporioides* a los 4 días de siembra.
a. En hoja de aguacate. b. En hoja de anona
Fuente: Autor



Figura 57. Cepas monospóricas aisladas de anona (izquierda) y aguacate (derecha).

Las diferencias entre ambos aislamientos son muy notorias, ya que la cepa aislada en anona presenta una coloración rosada debido a la presencia de conidiosomas, la formación excesiva de acérvulos y poco crecimiento micelial, mientras que en la cepa aislada de aguacate presenta un excesivo crecimiento de micelio de color negro, poca formación de acérvulos y conidiosomas. Por lo tanto, al aislamiento realizado de anona corresponde diferenciarlo como acervular, y al aislamiento realizado de aguacate corresponde diferenciarlo como cepa micelial; sobre la base del trabajo de Muller (28) y Torres, *et al* en café (29).

6.2.1 Obtención de cepas

A cada aislamiento monospórico realizado en hojas, flor y fruto corresponde a una cepa específica de *C. gloeosporioides*, logrando la purificación de cinco cepas

En el cultivo de Anona están los siguientes aislamientos:

CAHAnC₁: *C. gloeosporioides* Aislado en Hoja de Anona Cepa uno.

CAFrAnC₂: *C. gloeosporioides* Aislado en Fruto de Anona Cepa dos.

En el cultivo de aguacate están los siguientes aislamientos:

CAHAgC₁: *C. gloeosporioides* Aislado en Hoja de aguacate Cepa uno.

CAFIAgC₂: *C. gloeosporioides* Aislado en Flor de aguacate Cepa dos.

CAFrAgC₃: *C. gloeosporioides* Aislado Fruto de aguacate Cepa tres.

6.2.2 Caracterización morfométrica de cepas

6.2.2.1 *Colletotrichum gloeosporioides* aislado en hoja de Anona (CAHAN_{C-1})



Figura 58. Características de *C. gloeosporioides* aislado en hoja de anona.

Fuente: Autor

Tabla 5. Características de *C. gloeosporioides* aislado en hoja de anona.

Micelio	Esporas
Micelio bundante poco denso De color blanco a grisáceo oscuro Micelio pegado al medio Setas presentes Crecimiento rápido de 11.2-15.5 mm/día	Crecimiento sonado de conidias (4 anillos) Formación abundante de masas conidiales Conidiosoma abundante de color salmón grisáceo Masas conidiales de color naranja



Figura 59. Conidias de *C. gloeosporioides* aislado en hoja de anona.

Fuente: Autor

Tabla 6. Dimensión de conidias de *C. gloeosporioides* aislado en hoja de anona.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	\bar{x}	S	S ²
Largo (µm)	16.00	15.43	13.71	13.71	11.43	14.17	13.49	15.09	14.74	13.49	15.89	12.00	13.49	15.09	14.40	15.89	12.80	12.46	15.09	14.06	14.12	1.31	0.35
Diámetro (µm)	4.57	5.14	4.80	5.03	5.71	5.49	5.26	5.37	5.03	5.49	4.80	5.49	5.03	5.60	5.83	5.14	5.49	5.60	5.71	5.60	5.31	1.71	0.12

Nota:

\bar{x} = Media

S= Desviación estándar

S²= Varianza

6.2.2.2 *Colletotrichum gloeosporioides* aislado en fruto de Anona (CAFrAnC₂)



Figura 60. Características de *C. gloeosporioides* aislado en fruto de anona.
Fuente: Autor

Tabla 7. Características de *C. gloeosporioides* aislado en fruto de anona.

Micelio	Esporas
Micelio abundante y denso De color blanco Micelio de crecimiento aéreo Setas ausente Crecimiento rápido de 8.7-9.6 mm/día	Crecimiento sonado de conidias (4 anillos) Formación abundante de masas conidiales Conidiosoma escaso de color salmón oscuro Masas conidiales de color naranja oscuro

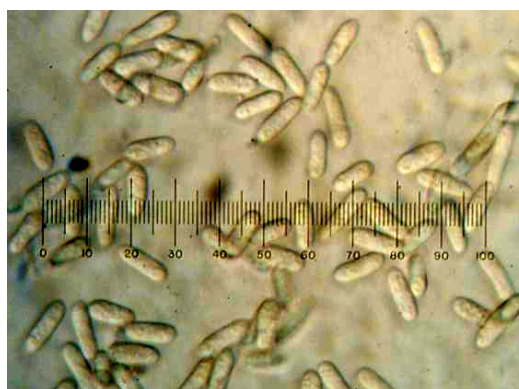


Figura 61. Conidias de *C. gloeosporioides* aislado en fruto de anona.
Fuente: Autor

Tabla 8. Dimensión de conidias de *C. gloeosporioides* aislado en fruto de anona.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	\bar{x}	S	S ²
Largo (µm)	14.86	14.86	14.86	12.57	12.00	14.29	15.09	13.71	14.29	13.26	14.86	12.00	13.49	15.09	12.80	14.51	15.31	13.60	12.00	15.20	13.93	1.15	0.41
Diámetro (µm)	5.71	4.57	5.14	4.57	5.71	5.49	5.71	5.60	5.71	5.60	5.71	5.49	5.26	5.49	5.14	4.80	4.69	5.71	5.60	5.71	5.37	1.33	0.17

Nota:

\bar{x} = Media

S= Desviación estándar

S²= Varianza

6.2.2.3 *Colletotrichum gloeosporioides* aislado en hoja de Aguacate (CAHAgC₁)



Figura 62. Características de *C. gloeosporioides* aislado en hoja de aguacate.

Fuente: Autor

Tabla 9. Características de *C. gloeosporioides* aislado en hoja de aguacate.

Micelio	Esporas
Micelio escaso y ralo De color blanco a grisáceo Micelio de crecimiento sub-aéreo Ocasionalmente produce Setas Crecimiento rápido de 8.1-9.2 mm/día	Crecimiento sonado de conidias (3 anillos) Poca abundancia de masas conidiales Conidiosoma de color grisáceo Masas conidiales de color naranja claro



Figura 63. Conidias de *C. gloeosporioides* aislado en hoja de aguacate.

Fuente: Autor

Tabla 10. Dimensión de conidias de *C. gloeosporioides* aislado en hoja de aguacate.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	\bar{x}	S	S ²
Largo (µm)	9.14	15.77	13.14	6.86	16.00	10.29	13.71	8.00	13.71	15.31	13.49	13.94	16.11	11.66	13.60	12.46	10.17	13.94	15.89	13.14	12.82	2.69	7.25
Diámetro (µm)	5.71	4.80	4.57	4.57	5.26	5.71	5.49	5.49	5.71	5.60	5.14	5.71	5.60	4.80	5.49	5.71	5.60	5.71	5.49	5.71	5.39	0.40	0.16

Nota:

\bar{x} = Media

S= Desviación estándar

S²= Varianza

6.2.2.4 *Colletotrichum gloeosporioides* aislado en flor de Aguacate (CAFIAGC₂)



Figura 64. Características de *C. gloeosporioides* aislado en flor de aguacate.

Fuente: Autor

Tabla 11. Características de *C. gloeosporioides* aislado en flor de aguacate.

Micelio	Esporas
Micelio escaso y medianamente denso	Crecimiento sonado de conidias (3 anillos)
Micelio de color blanco	Poca abundancia de masas conidiales
Micelio de crecimiento sub-aéreo	Conidiosoma escaso de color salmón
Setas ausentes	Masas conidiales de color canela
Crecimiento rápido de 7.9-8.5 mm/día.	



Figura 65. Conidias de *C. gloeosporioides* aislado en flor de aguacate.

Fuente: Autor

Tabla 12. Dimensión de conidias de *C. gloeosporioides* aislado en flor de aguacate.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	\bar{x}	S	S ²
Largo (µm)	13.83	18.40	6.86	13.60	12.80	12.00	15.43	12.00	8.91	15.09	13.14	14.63	8.57	16.00	14.74	12.34	13.14	15.09	16.23	10.06	13.14	2.85	8.15
Diámetro (µm)	4.34	4.57	4.80	4.57	5.14	8.00	4.57	4.80	4.46	4.69	4.46	4.80	5.83	4.80	4.34	4.80	4.57	5.71	5.49	5.14	4.99	0.83	0.68

Nota:

\bar{x} = Media

S= Desviación estándar

S²= Varianza

6.2.2.5 *Colletotrichum gloeosporioides* aislado en fruto de Aguacate (CAFIAGC₃)

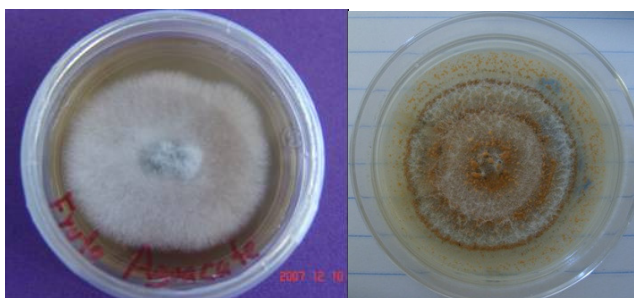


Figura 66. Características de *C. gloeosporioides* aislado en fruto de aguacate.

Fuente: Autor

Tabla 13. Características de *C. gloeosporioides* aislado en fruto de aguacate.

Micelio	Esporas
Micelio abundante y medianamente denso De color blanco grisáceo Micelio de crecimiento sub-aéreo Setas presentes Crecimiento rápido de 11.3-15.4 mm/día	Crecimiento sonado de conidias (3 anillos) Poca formación de masas conidiales Conidiosoma escaso de color salmón claro Masas conidiales de color canela oscuro



Figura 67. Conidias de *C. gloeosporioides* aislado en fruto de aguacate.

Fuente: Autor

Tabla 14. Dimensión de conidias de *C. gloeosporioides* aislado en fruto de aguacate.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	\bar{x}	S	S ²
Largo (µm)	20.80	10.29	13.71	13.14	11.43	9.37	8.00	16.57	14.63	17.14	16.00	13.49	8.57	15.77	13.14	7.77	16.00	14.74	13.14	11.31	13.25	3.40	11.55
Diámetro (µm)	4.00	5.71	5.71	5.49	5.71	5.60	5.83	5.49	5.14	5.49	5.71	5.71	5.60	5.71	5.60	5.71	5.60	5.83	5.26	5.71	5.53	0.40	0.16

Nota:

\bar{x} = Media

S= Desviación estándar

S²= Varianza

6.3 Diagnóstico molecular de cepas

Se realizó mediante la identificación de los espaciadores de transcripción interna (ITS, por sus siglas en inglés), ya que esta permite la identificación de la especie, usando como marcador la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN molecular. 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. La región ITS es quizá ahora el fragmento de ADN más secuenciado en hongos y ha sido muy útil para estudios de sistemática molecular al nivel de especie y aún dentro de especies. Con los resultados de secuenciación se constató que las cepas de los diferentes aislamientos del hongo provenientes de la antracnosis de aguacate y anona son de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc.

En la figura 32 se puede apreciar la amplificación del ADN ribosomal de las diferentes cepas aisladas de aguacate y anona en gel de agarosa. El lader es un marcador molecular que nos sirve de referencia, la numeración de 1 a 3 son las cepas de aisladas de hoja, fruto y flor de aguacate, de 3 a 5 son las cepas de hoja y fruto de anona respectivamente.

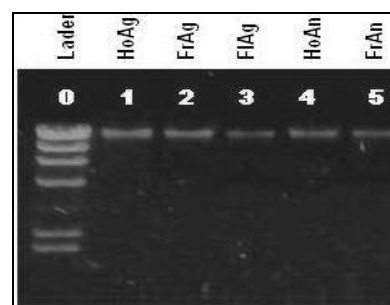


Figura 68. Separación en gel de agarosa al 0.8% de productos amplificados por PCR para las regiones ITS del ADN ribosomal de las cepas de *C. gloeosporioides* aislados en aguacate y anona.

Fuente: Autor

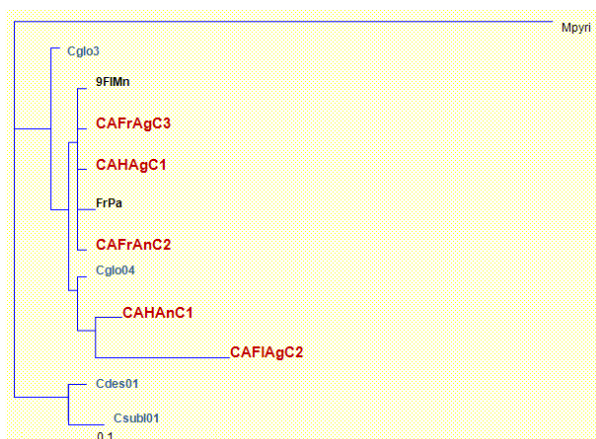


Figura 69. Árbol Filogenético de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Se trabajaron dos secuencias de *C. gloeosporioides* (Cglo3 y Cglo04) amplificadas en la región 5.8S y un grupo externo (Mpyri) obtenidos en el Banco de genes de MacroGen para comparar las cepas diagnosticadas. Como se puede observar las cepas trabajadas se alinean a las dos secuencias de *C. gloeosporioides* obtenidas del banco de genes.

CAHAnC1: cepa aislada en hoja de anona
CAFrAnC2: cepa aislada en fruto de anona
CAHAgC1: cepa aislada en hoja de aguacate
CAFIAgC2: cepa aislada en flor de aguacate
CAFrAgC3: cepa aislada en fruto de aguacate

Fuente: Autor.

6.4 Pruebas de patogenicidad

6.4.1 Pruebas de patogenicidad en aguacate



a) Recolección de frutos sanos de aguacate

b) Desinfección de fruto

c) Señalización de puntos de infección

Figura 70. Recolección y desinfección de frutos de aguacate.

Fuente: Autor



a) Inoculación de cepa de fruto de aguacate a los 48 ddi. Formación de micelio.

b) Inoculación de cepa de fruto de aguacate a los 96 ddi. Formación abundante de acérvulos

c) Inoculación de cepa de hoja de aguacate a los 48 ddi. Inicio de formación de micelio de color blanco-grisáceo.

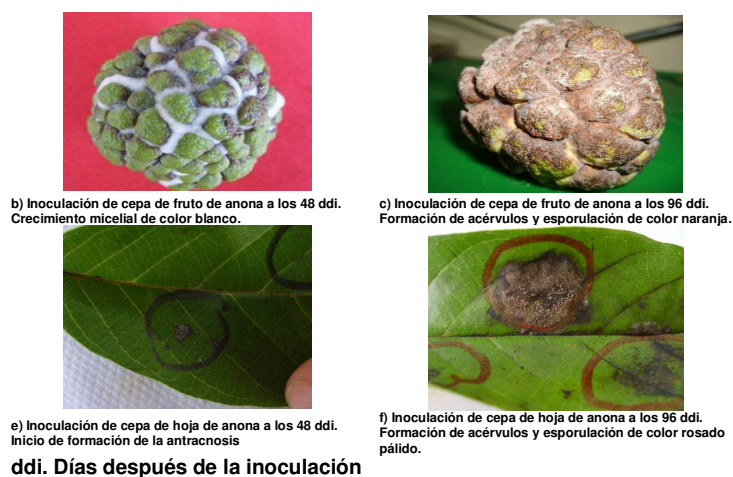
d) Inoculación de cepa de hoja de aguacate a los 96 ddi. Antracnosis de color marrón oscuro.

Nota: ddi= días después de la infección.

Figura 71. Pruebas de patogenicidad en frutos y hojas de aguacate.

Fuente: Autor

6.4.2 Pruebas de patogenicidad en anona



b) Inoculación de cepa de fruto de anona a los 48 ddi. Crecimiento micelial de color blanco.

c) Inoculación de cepa de fruto de anona a los 96 ddi. Formación de acérvulos y esporulación de color naranja.

e) Inoculación de cepa de hoja de anona a los 48 ddi. Inicio de formación de la antracnosis

f) Inoculación de cepa de hoja de anona a los 96 ddi. Formación de acérvulos y esporulación de color rosado pálido.

ddi. Días después de la inoculación

Figura 72. Pruebas de patogenicidad en fruto y hoja de anona.

Fuente: Autor

El tiempo de infección de *Colletotrichum gloeosporioides* en ambas pruebas no fue variable, debido a que ambos patógenos son potencialmente infectivos a los dos días (48 horas después de la inoculación).

6.5 Pruebas de infección cruzada

6.5.1 Pruebas de infección cruzada en aguacate

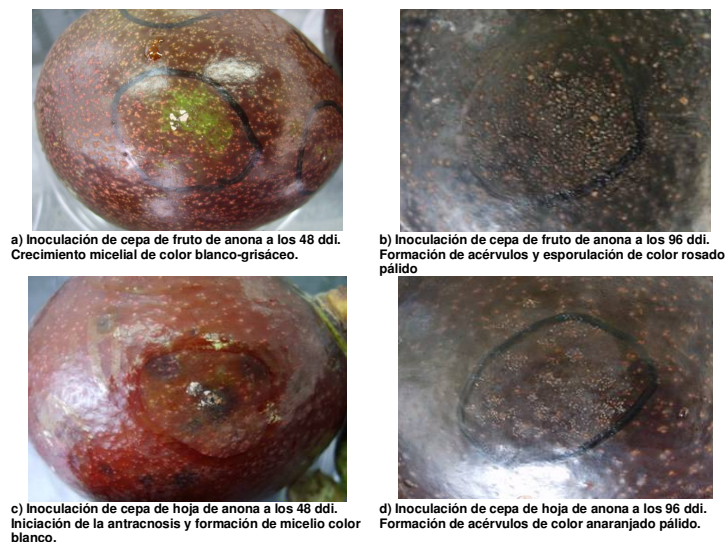


Figura 73. Pruebas de infección cruzada de cepas de anona en frutos de aguacate.

Fuente: Autor



Figura 74. Pruebas de infección cruzada de cepas anona en hojas en aguacate.

Fuente: Autor

La infección cruzada se hizo evidente a las 48 horas después de haber realizado la inoculación de las diferentes cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*. Se puede deducir que tanto el cultivo de aguacate y anona son susceptibles a las cepas de *C. gloeosporioides* aisladas de ambos cultivos. La antracnosis en hojas y frutos típicamente

aparecen como manchas de colores oscuros, o lesiones ligeramente sumidas que poseen un contorno ligeramente levantado.

6.5.2 Pruebas de infección cruzada en anona



a) Inoculación de cepa de fruto de aguacate a los 48 ddi. Formación de micelio de color blanco.



b) Inoculación de cepa de fruto de aguacate a los 96 ddi. Con poca formación de acérvulos y conidias.



c) Inoculación de cepa de flor de aguacate a los 48 ddi. Con poca formación de micelio color blanco.



d) Inoculación de cepa de flor de aguacate a los 96 ddi. Con abundante formación de acérvulos y conidias de color rosado



e) Inoculación de cepa de hoja de aguacate a los 48 ddi. Con abundante formación de micelio color blanco.



f) Inoculación de cepa de hoja de aguacate a los 96 ddi. Con abundante formación de acérvulos y conidias de color rosado

Figura 75. Pruebas de infección cruzada de cepas de aguacate en frutos de anona.

Fuente: Autor

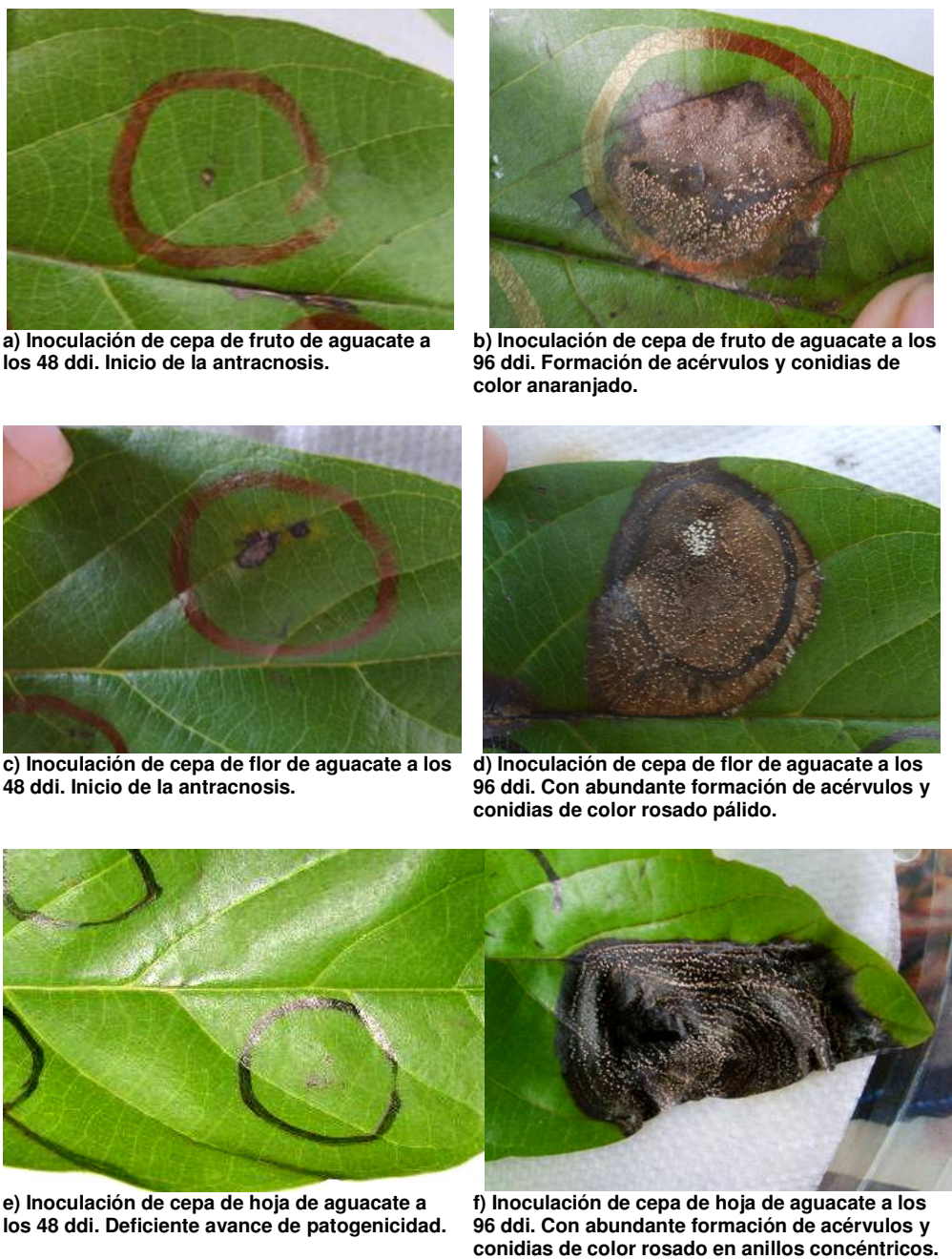


Figura 76. Pruebas de infección cruzada de cepas de aguacate en hojas de anona.

Fuente: Autor

En algunos frutos y hojas producen pequeños acérvulos negros dispuestos en forma concéntrica o dispersa en las lesiones, como es el caso de la figura 37r.

6.6 Pruebas de Protección cruzada

Queda descartada la posibilidad de protección cruzada como manejo de la antracnosis postcosecha, ya que existe el fenómeno de infección cruzada entre cepas aisladas de aguacate y anona. El alto potencial de infección cruzada de las cepas *C. gloeosporioides* podría favorecer la aparición de nuevas cepas con diferente patogenicidad.

VII. CONCLUSIONES

Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz & Sacc, presenta variabilidad morfo-métrica entre cepas aisladas de aguacate y anona en términos de forma y color de las colonias y en cuanto a la dimensión de las esporas.

Sobre la base de las pruebas de patogenicidad se constató que las cepas de *C. gloeosporioides* aisladas de aguacate y anona son patógenos agresivos tanto en anona y aguacate.

Existe el fenómeno de infección cruzada entre cepas aisladas de aguacate y anona, por lo tanto, queda descartada la posibilidad de protección cruzada como manejo de la antracnosis postcosecha.

Con los resultados del diagnóstico molecular, se constató que las cepas del hongo provenientes de la antracnosis aguacate y anona es sin ninguna duda razonable de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc.

VIII. RECOMENDACIONES

Desarrollar este estudio a todos los frutales y plantas que sean afectados por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc, en la búsqueda del fenómeno de Protección Cruzada.

Evaluar la protección de frutos en el campo con la finalidad de obtener frutos limpios, para una mayor vida de anaquel o embalaje.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Adaskaveg, JE; Hartin, RJ. 1997. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87:979-987.
2. Agrios, GN. 2005. *Plant pathology*. 5 ed. New York, US, Academic Press. 922 p.
3. Alahakoon, PW; Brown, AE; Sreenivasaprasad, S. 1994. Cross-infection potential of genetic of *Colletotrichum gloeosporioides* on tropical fruits. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44:93-103.
4. Álvarez, E; Andrés-Ospina, C; Fernando Mejía, J; Llano, GA. 2004. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanaba (*Annona muricata*) en el valle del Cauca. Cali, Colombia, CIAT. p. 1-8.
5. Aramburu, *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 set 2007. Disponible: <http://www.agroinformacion.com/leer-articulo.aspx?not=411>
6. Barnett, HL; Hunter, BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. American Phytopathological Society, 4th Edition. St. Paul, Minnesota.
7. Castro Retana, JJ; Cerdas Araya, MM; Umaña Rojas, G. 2007. Manual de manejo poscosecha de anona (*Annona cherimola* Mill). San José, Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería / Universidad de Costa Rica. 67 p.
8. Coleman, WB; Tsongalis, GJ. 2006. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. Humana Press. p. 47-56, 65-74.
9. Crane, JH; Balerdi, CF; Campbell, CW. 1990. *El aguacate en Florida*. Trad. Rubén Regalado y CF Balerdi. Florida, US, Universidad de Florida. 9 p.
10. Dickman, MB. 2006. [Colletotrichum gloeosporioides](http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/type/c_gloeo.htm) (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
11. Freeman, S. 2000. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. *In* Prusky, D; Freeman, S; Dickman, MB (eds.). *Host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. The American Phytopathological Society p. 131-141.
12. Freeman, S; Katan, T; Shabi. 1998. Characterización of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-605.

13. Granados Friely, JC. 2007. Teoría geográfica del desarrollo de la fruticultura. *In* Tendencias globales del mercado internacional de las frutas. Guatemala, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. p. 1-17. 1 CD.
14. Manners, JM; Masel, A; Irwin, JA. 1993. Molecular genetics of *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Stylosanthes*. *In* Isaac, S; Franklan, JC; Watling, R; Whalley, AJ. S. (eds.). Aspects of tropical mycology. Cambridge, Cambridge University Press.
15. Matta, G. 1984. Diagnostico general del parcelamiento Cuyuta, Masagua, Escuintla, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, FAUSAC. 13 p.
16. Muller, RA. 1992. Algunos aspectos de un problema patológico grave que constituye una amenaza para la caficultura latinoamericana. Instituto Francés de café y cacao (IRCC): 124-132.
17. NCBI (National Center for Biotechnology Information, US). (en línea). US. Consultado 5 mar 2008. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
18. Nuckles, EM; Kuc, J. 1988. Induced resistance to anthracnose in cucumber. *In* Baudoin, ABAM. (ed.). Laboratory exercises in plant pathology: an instructional kit. The American Phytopathology Society p. 16-18.
19. O'Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) (en línea). Chile, Curr. Genet. 22:213–220. Consultado 15 nov 2007. Disponible: <http://www.umce.cl/delgenalaproteina/mo dulos/modulo12.php>
20. Quiñónez, J. 2006. Información general del ICTA – Cuyuta (entrevista). Cuyuta, Escuintla, Guatemala, ICTA, Dirección.
21. Reyes-Amado, C; Morales-García, L. 2002. Determinación de la temperatura óptima de desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. en aguacate Hass, en la zona aguacatera de Michoacán. México. p. 1-8.
22. Rodríguez González, AF. 2007. Caracterización molecular de poblaciones de *Colletotrichum* spp. asociadas a *Coffea arabica* en Colombia y su aplicación en el diagnóstico del CBD. Tesis Microbiol. Industrial. Bogotá, Colombia, Pontificia Universidad de Javeriana. 108 p.
23. Rondón Garnier, AJ. 1991. La producción frutícola con fines de exportación problemas patológicos y alternativas de control. Maracay, Venezuela, FONAIAP / CENIAP, Departamento Protección Vegetal, FONAIAP Divulga no. 36.
24. Sierra, O. 2006. Información general del ICTA – Cuyuta, frutales (entrevista). Cuyuta, Guatemala, ICTA, Departamento de Frutales.

25. Soliveri, J; Caballero, JL; Muñoz-Blanco, J; Copa-Patiño, JL. 2003. Aproximaciones biotecnológicas para la producción y ensayo de compuestos inductores de mecanismos de defensa en plantas: aplicaciones de interés agrícola. Agroinformación. Consultado 16 set 2007. Disponible en www.agroinformación.com/leerarticulo.aspx?not=109
26. Sutton, B. 1980. The coelomycetes: the fungi imperfecti with pycnidia, acérvuli and stromata. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute. 661 p.
27. Sutton, BC. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In Bailey, JA; Jeger, MJ. (eds). *Colletotrichum – biology, pathology and control*. Wallengford, País, CAB International. p. 1-26.
28. Torres, ZM; Monterroso, SD; Gutiérrez, A. y Góngora, J. 1994. Caracterización morfológica y cuantitativa de *Colletotrichum* aislado de *Coffea arábica* en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 34: 28-30.
29. Valadez Moctezuma, E; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN de genomas de plantas. Teoría y protocolos del laboratorio. México. Grupo Mundi-Prensa. 39 p.
30. Waller, JM; Bridge, PD; Black, B; Hakiza, G. 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. *Mycological Research* 97(8):989-994.
31. Zolan, ME; Pukkila, PJ. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and cellular Biology* 6:195-200.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Glosario

- Acérvulo:** Cuerpo fructífero asexual, subepidérmico y en forma de plato que produce conidios en conidióforos cortos.
- Ácido nucleico:** Sustancia ácida constituida por una pentosa, fósforo y bases púricas o pirimídicas. Los ácidos nucleicos determinan los caracteres genéticos de los organismos.
- Agar:** Sustancia de consistencia gelatinosa que se obtiene de las algas marinas y que se utiliza para preparar medios de cultivo nutritivos en los que se estudia y cultiva a los microorganismos.
- Aislado:** Una sola espora o cultivo y los cultivos que se derivan de ellos. Se utiliza también para indicar las colecciones de un patógeno obtenidas a diferentes tiempos.
- Aislamiento:** Separación de un patógeno a partir de su hospedante y su cultivo en un medio nutritivo.
- Antracnosis:** Enfermedad que se manifiesta como lesiones negras profundas de la hoja, tallo o fruto y que es causada por hongos que producen sus esporas sexuales en un acérvulo.
- Apresorio:** Extremo hinchado de una hifa o tubo germinativo que facilita la fijación y penetración de un hongo en su hospedante.
- Avirulento:** Que carece de virulencia.
- Bioensayo:** Uso de un organismo como prueba, para medir la infectividad relativa de un patógeno o la toxicidad de una sustancia.
- Cepa:** Progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro; aislado; grupo de aislados similares; una raza. En los virus de las plantas, es un grupo de aislados virales que comparten en común la mayoría de sus antígenos.
- Ciclo de la enfermedad:** Todos los eventos comprendidos en el desarrollo de la enfermedad, incluyendo las etapas de desarrollo del patógeno y el efecto de la enfermedad sobre el hospedante.
- Codificación:** Proceso por el cual la secuencia de nucleótidos de una cierta porción de RNA, determina la secuencia de aminoácidos durante la síntesis de una proteína en especial.
- Codón:** Unidad de codificación que consta de tres nucleótidos adyacentes y que codifica para un aminoácido específico.
- Conidio:** Espora asexual de un hongo formada en el extremo de un conidióforo.
- Conidióforo:** Hifa especializada sobre la cual se forman uno o más conidios.
- Control biológico:** Destrucción parcial o total de las poblaciones del patógeno por medio de otros organismos.
- Control integrado:** Proceso que intenta utilizar todos los métodos disponibles para el control de una enfermedad, o de todas las enfermedades y plagas de un cultivo para lograr un mejor control al menor costo y con un daño mínimo al ambiente.
- Cultivo:** Crecimiento artificial de microorganismos o tejidos vegetales en un medio nutritivo preparado; colonia de microorganismos o células vegetales mantenidos artificialmente en dicho medio nutritivo.
- Desinfectante:** Agente físico o químico que impide la infección de una planta, órgano o tejido.
- Desinfestante:** Agente que destruye o inactiva a los patógenos del ambiente o de la superficie de una planta u órgano, antes de que ocurra la infección.
- DNA complementario (DNAC):** DNA sintetizado por la transcriptasa inversa a partir de un molde de RNA.
- Enfermedad:** Cualquier mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedante, que resulta de las irritación continua por un agente patogénico o factor ambiental y que lleva el desarrollo de síntomas.
- Enzimas de restricción:** Grupo de enzimas de origen bacteriano que rompen los enlaces internos del DNA en puntos altamente específicos.
- Esclerocio:** Masa compacta de hifas que puede o no contener tejidos del hospedante, por lo común con una cubierta oscura y capaz de sobrevivir bajo condiciones ambientales desfavorables.
- Espora:** Unidad reproductiva de los hongos que consta de una o varias células; es análoga a la semilla de las plantas verdes.
- Etapas imperfectas:** Fase del ciclo de vida de un hongo en la que no se producen esporas sexuales. La fase anamórfica.
- Hifa:** Ramificación simple de un micelio.
- Hongo imperfecto:** Hongo del que no se sabe que produzca esporas sexuales.
- In vitro:** En cultivo; fuera del hospedante.
- In vivo:** En el hospedante.
- Infección:** Establecimiento de un parásito dentro de una planta hospedante.
- Infección latente:** Etapa en la que un patógeno infecta a su hospedante sin que este último muestre síntoma alguno.
- Infección primaria:** Primera infección que sufre una planta causada por un patógeno que sobrevive al verano o invierno.
- Infección secundaria:** Cualquier infección causada por un inóculo y que se produce como resultado de una infección primaria o consecutiva; infección causada por un inóculo secundario.
- Inmune:** Que no puede ser infectado por un determinado patógeno.
- Inoculación:** Arribo o transferencia de un patógeno sobre su hospedante.
- Inoculación mecánica:** inoculación de un virus en una planta por medio de la transferencia de savia de una planta infectada por un virus a una planta sana.
- Inóculo:** Patógeno o partes de él que causa infección; partes de los patógenos que entran en contacto con el hospedante.

Inóculo primario: Patógeno o esporas de éste que sobreviven al verano o invierno y que causan la infección primaria.

Inóculo secundario: Inóculo que se produce por las infecciones que ocurren durante una misma estación de crecimiento.

Lesión: Área localizada de tejido enfermo o decolorado.

Lesión local: Mancha foliar localizada que produce un virus mediante inoculación mecánica.

Medio de cultivo: Medio nutritivo preparado en el que se cultivan microorganismos o células vegetales.

Micelio: Hifa o masa de hifas que constituyen el soma de un hongo.

Micrómetro (μm): Unidad de longitud que equivale a una milésima parte de un milímetro.

Nucleótido: Ester fosfórico de un nucleósido. Los nucleótidos son las unidades estructurales del DNA y RNA.

Patogenicidad: Capacidad que tiene un patógeno para producir enfermedad.

Patógeno: Entidad que causa enfermedad.

Penetración: Invasión inicial por un hospedante por un patógeno.

Promotor: Región del DNA o RNA que es reconocida por la RNA polimerasa para iniciar la transcripción.

Protección cruzada: Fenómeno por el cual los tejidos vegetales infectados por la cepa de un virus, contrarrestan la infección por otras cepas del mismo virus.

Reproducción asexual: Cualquier forma de reproducción que no implique meiosis o la fusión de gametos.

Resistencia: Capacidad que tiene un organismo para superar, totalmente o hasta cierto grado, el efecto de un patógeno u otro factor perjudicial.

Resistencia horizontal: Resistencia parcial igualmente efectiva contra todas las razas de un patógeno.

Resistencia vertical: Resistencia completa a algunas razas de un patógeno, pero no a otras.

Resistente: Que tiene las cualidades para impedir el desarrollo de un determinado patógeno. Que es infectado o si lo es, en grado mínimo.

RNA (ácido ribonucleico): Ácido nucleico que interviene en las síntesis de proteínas; es también el ácido nucleico más común en los virus que infectan a las plantas.

RNA de transferencia (RNAt): Molécula de RNA que transporta los aminoácidos hasta el ribosoma para colocarlos en el orden determinado por el RNA mensajero.

RNA mensajero: Cadena de ribonucleótidos que codifica para una proteína específica.

RNasa (ribonucleasa): Enzima que degrada al RNA.

Septado: Que tiene septos o paredes transversales.

Septo: Pared transversal de las hifas o esporas.

Signo: Patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante.

Síntoma: Reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad.

Susceptibilidad: Incapacidad de una planta para resistir el efecto de un patógeno o otro factor perjudicial.

Tejido: Conjunto de células de estructura similar que llevan a cabo una función especial.

Tiro de munición: Síntomas en el que pequeños fragmentos enfermos de las hojas se desprenden y dejan pequeños orificios en su lugar.

Tolerancia: Capacidad que tiene una planta para soportar los efectos de una enfermedad sin que muera, sufra daños serios o se pierda la cosecha. Es también la cantidad de residuos tóxicos tolerables en los órganos comestibles de las plantas.

Toxicidad: Capacidad de un compuesto para causar daño.

Traducción: Copia del RNAm en proteína.

Transcripción: Copia de un gen en RNA. Es también la copia de un RNA viral en un RNA complementario.

Transcripción inversa: Copia de un RNA en DNA.

Transferencia: Transferencia de material genético de una bacteria a otra mediante la participación de un bacteriófago.

Virulencia: Grado de patogenicidad de un patógeno.

Virulento: Capaz de causar una enfermedad severa; notablemente patogénico.

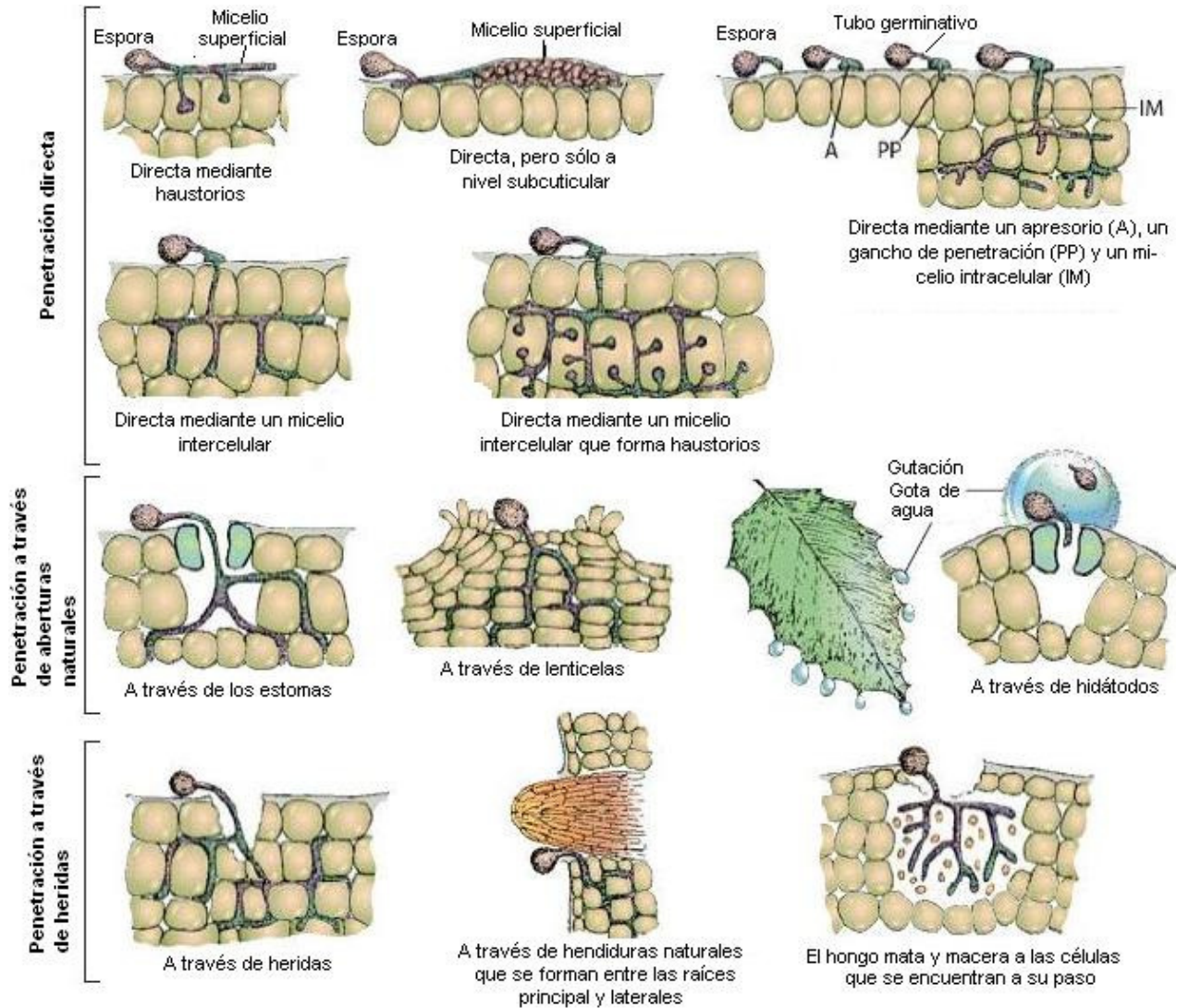
Agrios, N. 2005.

Anexo 2. Clave taxonómica de melanconiales

1a	Conidia 1-celled, short, not filiform	2
1b	Conidia 2-to several-celled, with transverse septa only, not filiform	7
1c	Conidia filiform, 1-to several-celled	12
1d	Conidia muriform, cross-shaped or star-shaped	14
2a	Conidia hyaline	3
2b	Conidia dark	<i>Melanconium</i>
3a	Conidia produced apically	4
3b	Conidia produced laterally on cells on conidiophores	<i>Catenophora</i>
4a	Conidia without appendages	5
4b	Conidia with apical, hyaline branched appendages	<i>Pestalotziella</i>
5a	Dark setae absent in acervulus	6
5b	Dark setae present in acervulus	<i>Colletotrichum</i>
6a	Conidiophores arising from a stromalike base	<i>Sphaceloma</i>
6b	Stromalike base absent	<i>Gloeosporium</i>
7a	Conidia 2-celled	8
7b	Conidia 3-to several-celled	9
8a	Conidium unequally 2-celled, without appendages	<i>Marssonina</i>
8b	Conidia equally 2-celled, with appendage or appendages at both ends	<i>Mycoleptodiscus</i> <i>Polynema</i>
9a	Conidia dark	10
9b	Conidia hyaline	<i>Septogloeum</i>
10a	Conidia with appendages, end cells hyaline	11
10b	Conidia with appendages, all cells dark	<i>Polynema</i>
10c	Conidia without appendages, all cells dark	<i>Coryneum</i>
11a	Single beaklike appendage at apex of conidia	<i>Monochaetia</i>
11b	Two or 3 apical appendages at apex of conidia	<i>Pestalotia</i>
11e	Appendages both apical and basal	<i>Seimatosporium</i>
12a	Parasitic on leaves	13
12b	Saprophytic on wood or bark	<i>Libertella</i>
13a	Conidia becoming septate	<i>Cylindrosporium</i>
13b	Conidia remaining 1-celled	<i>Cryptosporium</i>
14a	Conidia catenulate, dictyosporous	<i>Phragmotrichum</i>
14b	Conidia not catenulate, shape variable	15
15a	Conidia dark, staurosporous	<i>Asterosporium</i>
15b	Conidia dark, dictyosporous	<i>Steganosporium</i>
15c	Conidia hyaline, staurosporous	<i>Entomosporium</i>

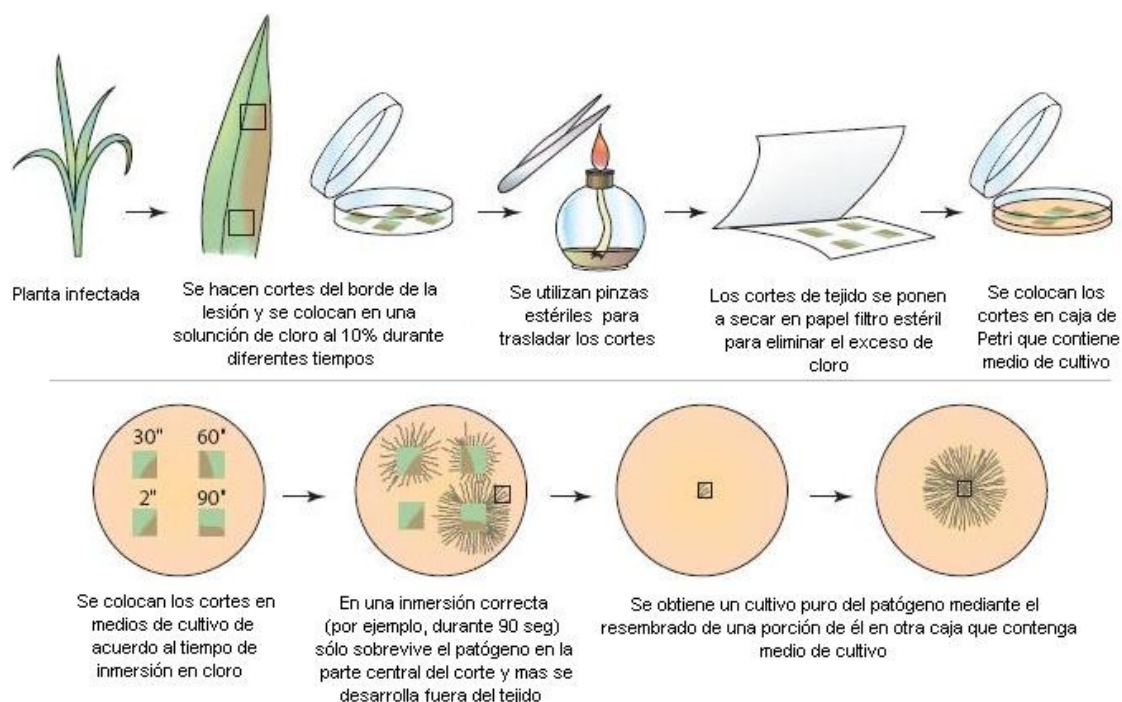
Fuente: Barnett *et al.*, 1972

Anexo 3. Métodos de penetración e invasión por hongos

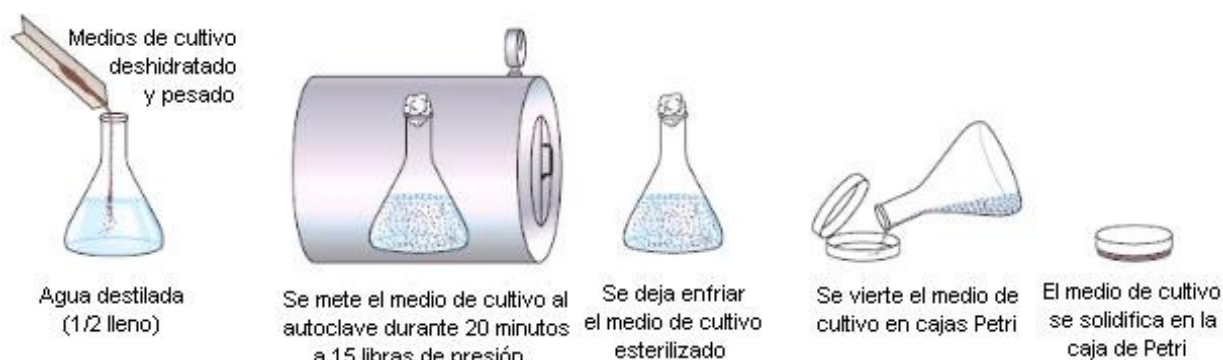


Fuente: Agrios, G.N., 2005

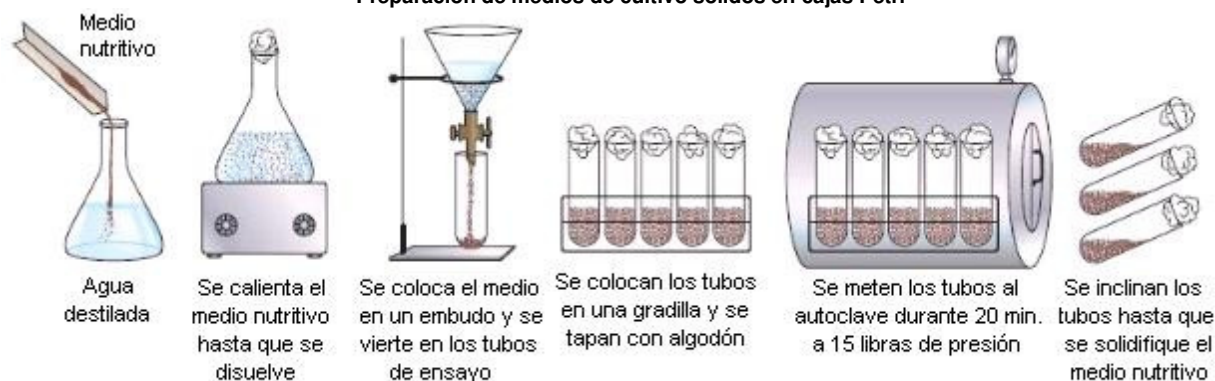
Anexo 4. Aislamiento de hongos patógenos del tejido una planta infectada.



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. Comprobante de orden de secuenciación de cepas de *Colletotrichum*

Macrogen Service Center Page 1 of 2

Basic information

order number: 080212FN-027
 data of order: 12/01/2008
 Service: Normal Service
 user ID: fholguin
 name: Francisco Holguin
 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 FedEx/DHL YES
 account:

We send 13 samples for sequencing, can you
 comment: 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

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

Referencia:

Cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de aguacate y anona para secuenciación.

Anexo 7. Manejo Poscosecha de la Anona

1. Recolección y manejo de la anona

Se debe cosechar con la mano y no colocar la fruta en el suelo. No se recomienda utilizar sacos para transportar la fruta cosechada, lo mejor es usar la caja plástica. Debido a que la anona tiene una cáscara muy fina que no le protege mucho de la pérdida de humedad, una vez que ha sido cortada del árbol debe ser colocada rápidamente a la sombra, o en lugares frescos donde no le pegue el sol directamente. La pérdida de humedad se refleja en pérdida de peso y de la frescura de la fruta. Por la delicadeza de su cáscara también se debe manejar con mucho cuidado, cuando se cosecha se coloca en las cajas sin tirarla; las cajas con las frutas se deben mover cuidadosamente, tanto a la hora de cargarlas como descargarlas de los camiones. El uso de amortiguadores, como espuma en las cajas o el empleo de papel periódico para envolver la anona, ayuda a reducir el impacto de los golpes. Cuando el transporte se hace por caminos difíciles, es necesario que se giren instrucciones a quienes manejen los camiones para que lo hagan en forma lenta para evitar que las frutas se golpeen entre ellas y contra las paredes de las cajas, además de reducir un poco el impacto de las vibraciones.

La anona tiene un alto contenido de una enzima llamada polifenoloxidasas, por lo que cuando la fruta sufre daños mecánicos como roces, desprendimiento de partes de la cáscara, magulladuras, rajaduras, etc., las células quedan en contacto con el aire y por acción de la enzima mencionada, se dan reacciones de oxidación que hacen que el tejido de la cáscara y la pulpa se oscurezca, afectando la apariencia.

2. Selección y clasificación de la anona

La anona debe ser seleccionada con el fin de eliminar la fruta que no cumple con los requerimientos del consumidor como puede ser:

- Muy pequeña o muy grande
- La fruta deforme
- Fruta con golpes, magulladuras
- Verde o muy madura
- Con perforaciones de insectos
- Con manchas negras
- Con pudriciones

3. Tratamientos poscosecha para la anona

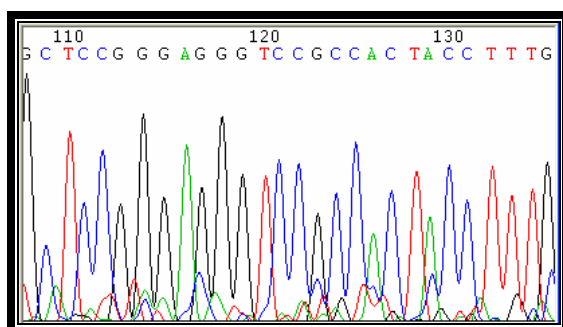
En algunos tratamientos para alargar el período de vida útil de la anona. Sumergir la fruta en iprodione (Rovral 500). Dentro de los principales resultados a obtener está el bajo efecto significativo de reguladores hormonales como el ácido giberélico, el conservador de color verde Pro-long tiende a mantener el color verde y la firmeza, pero pueden sufrir alteraciones en cuanto a las cualidades organolépticas (olor, sabor), las ceras no tienen efecto sobre la evolución de la madurez, pero si reducen la deshidratación dándole un buen brillo a la fruta, el uso de absorbedores de etileno no provocan cambios sobre la evolución de la madurez y no alteran las características de olor y sabor.

En Costa Rica se realizó una prueba donde previo al almacenamiento a 12 °C, a la mitad de la fruta cosechada no se le aplicó fungicida y la otra mitad se sumergió en una solución con el fungicida procloraz. Las evaluaciones se hicieron a los 8 y 15 días después de mantenerla a 12 °C y un día a temperatura ambiente. Como resultados se obtuvo que a medida que el tiempo transcurrió, se incrementó el porcentaje de fruta que presentó oxidación en el eje central y en la parte interna de la cáscara, así como fermentación de pulpa, translucidez y pudrición. Al analizar el efecto del fungicida se notó que éste no tuvo influencia sobre la oxidación, resultando los valores de esta variable muy altos tanto en el tratamiento testigo como en el tratamiento con procloraz. Sin embargo, si hubo un efecto del fungicida disminuyendo la fruta fermentada, fruta podrida, eje podrido y pulpa translúcida 15 días después de estar en almacenamiento.

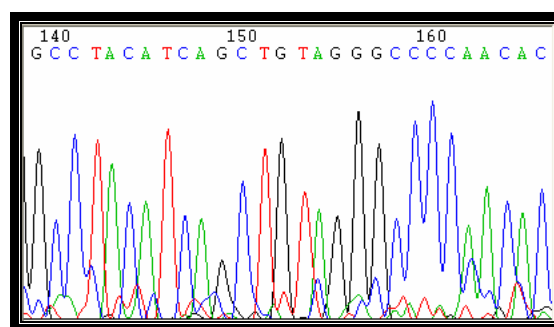
Es importante enfatizar la importancia de todos los cuidados preventivos que se le debe de dar a la fruta desde el campo y durante la cosecha para evitar el desarrollo de lesiones, pues los tratamientos en poscosecha básicamente lo que van a hacer es retrasar el desarrollo de estas lesiones, pero si estas son muy abundantes, la eficacia del tratamiento poscosecha es muy baja.

(Castro *et al*, 2007)

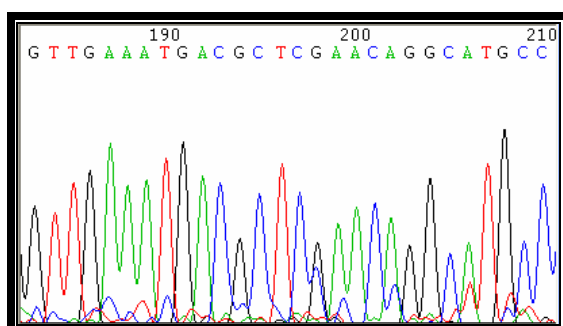
Anexo 8. Secuencias de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*.



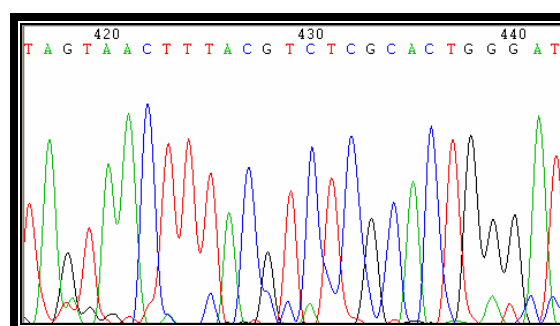
CAHAnC1
Cepa aislada en hoja de anona



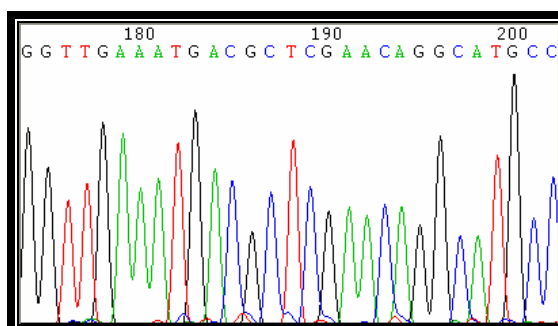
CAFrAnC2
Cepa aislada en fruto de anona



CAHAgC1
Cepa aislada en hoja de aguacate



CAFIAgC2
Cepa aislada en flor de aguacate



CAFrAgC3
Cepa aislada en fruto de aguacate

Secuencias de cepas de *C. gloeosporioides* editadas en el programa ClustalX, para la determinación de la especie.

CAPÍTULO III. SERVICIOS

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

I. Presentación

El Programa de Frutales Tropicales del Centro de Investigaciones del Sur del ICTA (ICTA-CISUR) se encuentra localizada en la aldea de Cuyuta, municipio de Masagua, departamento de Escuintla, este parcelamiento se encuentra ubicado en el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola 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 Agrícola (EPSA), realizando diferentes actividades agrícolas y de investigación.

El área de frutales cuenta con una diversidad de especies que aun no han sido rotulados o identificados, tales como: aguacate, anona, guayaba, mango, papaya, carambola, etc. Siendo este uno de los mas 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 arboles frutales del parcelamiento.

El Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola es una entidad del estado que en parte se encarga de brindar información técnica a la persona que desea solicitarla, y de ahí surge el servicio de la elaboración de un CD interactivo, el cual contiene la información técnica de los diferentes especies de frutales ubicados 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 Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) aislados en Anona, Aguacate, Carambola, Papaya, Mango y Guayaba.

II. Objetivos

2.1 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.

2.2 Específicos

- Identificar mediante el uso de rótulos las diferentes especies frutícolas que se encuentran en la estación de frutales **ICTA-CUYUTA**.
- Grabar un disco compacto (CD) 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 permita mejorar la conservación del patógeno y a su vez ahorrar espacio físico.

III. Servicios realizados

3.1 Servicio 1. Rotulación de especies frutícolas

3.1.1 Objetivo

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

3.1.2 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.

3.1.2.1 Adquisición de los materiales

Dentro de los materiales que se adquirieron están: Una lamina 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.



Figura 77. Adquisición de materiales para la rotulación.

Fuente: Autor

3.1.2.2 Corte de rótulos

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

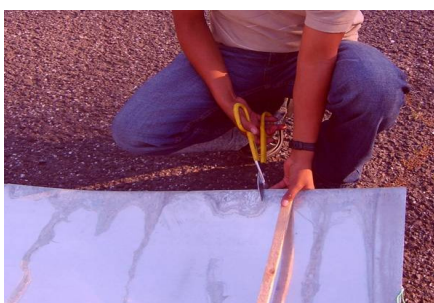


Figura 78. Corte de rótulos.

Fuente: Autor

3.1.2.3 Unión de rótulos y soporte

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

3.1.2.4 Pintado de rótulos

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



Figura 79. Pintado de rótulos.

Fuente: Autor

3.1.2.5 Contenido de rótulos

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

3.1.2.6 Colocación de rótulos

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

3.1.3 Resultados

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



Figura 80. Colocación de rótulos.

Fuente: Autor

3.1.4 Evaluación

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

3.2 Servicio 2. Elaboración de CD interactivo

3.2.1 Objetivo

Contribuir a la biblioteca de la estación del ICTA-Cuyuta, brindando información importante de las diferentes especies frutales ubicadas en el programa de frutas tropicales.

3.2.2 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.

3.2.2.1 Adquisición de materiales

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

3.2.2.2 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 Arview para graficarlo, como también, el uso de orto-fotos del Centro de Investigaciones.

3.2.2.3 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.

3.2.3 Resultados

La grabación de este disco compacto (CD, por sus en ingles), es de gran ayuda a la biblioteca de la estación del ICTA-Cuyuta, ya que los registros con los que se cuentan sobre diferentes especies de árboles frutales, no están en 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 81. Presentación del CD interactivo.

Fuente: Autor

3.2.4 Evaluación

Se elaboró el CD interactivo con su respectivo hipervínculo sobre la información técnica sobre el mapa del área de frutales de ICTA-CISUR, Cuyuta.



Figura 82. Contenido CD Interactivo, Cultivo del Aguacate.

Fuente: Autor

3.3 Servicio 3. Elaboración de Cepario

3.3.1 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 permitan mejorar la conservación del patógeno y a su vez ahorrar espacio físico.

3.3.2 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 colocados de manera adecuada y de fácil transportación.

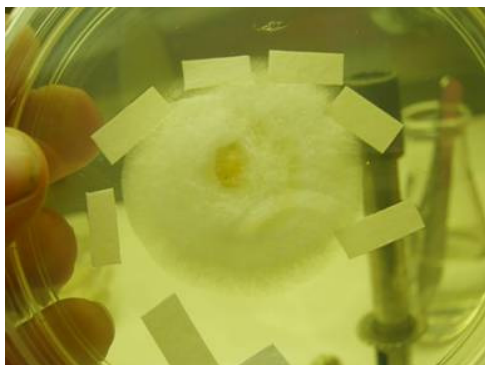


Figura 83. Fragmentos de papel filtro para la realización de copias de cepas.

3.3.3 Resultados

Se colocaron en conservación cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas de anona, aguacate, guayaba, carambola, papaya y mango, haciendo uso de una nueva técnica de conservación en papel filtro y agua esterilizados, 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 84. Cepario de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Este es un método efectivo de conservación, ya que luego de pruebas de activación del hongo de cada cepa, las cuales consisten en colocar el material fitopatológico en medio de cultivo (ej. Extracto malta-agar), se ha podido evidenciar que el hongo aún esta en capacidad de reproducirse y de infectar a las plantas.

3.3.4 Evaluación

Se lograron aislar dos cepas de anona, tres cepas de aguacate, tres cepas de carambola, dos cepas de guayaba, cuatro cepas de mango y dos cepas de papaya.

De las dieciséis cepas aisladas de los diferentes árboles frutales, se realizaron 14 copias de cada una.