

# ESPECIES DE *Colletotrichum* EN CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Mill.)

## SPECIES OF *Colletotrichum* IN CHERIMOYA (*Annona cherimola* Mill.)

Ramón Villanueva-Arce<sup>1</sup>, María de J. Yáñez-Morales<sup>2\*</sup>, Ana M. Hernández-Anguiano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional. 07340. Avenida Acueducto s/n. Ticomán, México, D. F. (rarce@ipn.mx). <sup>2</sup>Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Km. 36.5 Carretera México-Texcoco. Texcoco, Estado de México (yanezmj@colpos.mx)

### RESUMEN

Dado que hay pocos estudios fitosanitarios en el cultivo de chirimoya, el objetivo de este estudio fue generar información sobre las especies de *Colletotrichum* asociadas con diferentes síntomas de enfermedad en frutos y hojas de chirimoya. En medios de cultivo papa-dextrosa-agar y papa-zanahoria-agar se seleccionaron seis aislamientos de *Colletotrichum* de frutos y hojas recolectados en el Estado de México y Michoacán. Se identificaron y analizaron molecularmente tres especies de *Colletotrichum* considerando las estructuras morfológicas asexuales y sexuales, las diferencias en cultivo, la identificación molecular de los genes rARN por PCR-ITS y las pruebas de patogenicidad. En frutos se identificó *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. orbiculare* como causantes de antracnosis, y *C. gloeosporioides*, de mancha negra y pudrición de pedúnculo. En hoja se encontró *C. gloeosporioides* asociado con síntomas de antracnosis. Las identificaciones se corroboraron molecularmente y las secuencias se depositaron en el Banco de Genes del NCBI. La especie *C. orbiculare* así como los síntomas de antracnosis, mancha negra y pudrición de pedúnculo constituyen nuevos reportes fitosanitarios en frutos y hojas de chirimoya.

**Palabras clave:** Antracnosis, mancha negra, pudrición de pedúnculo.

### INTRODUCCIÓN

En regiones tropicales y subtropicales *Colletotrichum* causa antracnosis en cereales, frutales, hortalizas, leguminosas y pastos (Freeman, 2000). En frutales, otros síntomas son: muerte descendente de ramas jóvenes en cítricos (*Citrus* spp.), tizón de flores en mango (*Mangifera indica* L.), y pudrición de corona en plátano (*Musa* spp.) (Waller, 1992). Varias especies de *Colletotrichum* pueden infectar un mismo hospedante, como en fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), donde *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds, *C. fragariae* Brooks y *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. causan pudrición en frutos, estolones, hojas y pecíolos (Smith y Black, 1990; Gunnell y Gubler, 1992). En cítricos, *C.*

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Septiembre, 2007. Aprobado: Julio, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 689-701, 2008.

### ABSTRACT

Given that there are few phytosanitary studies of the chirimoya crop, the objective of this study was to generate information of the species of *Colletotrichum* associated with different symptoms of disease in fruits and leaves of chirimoya. In culture media of potato-dextrose-agar and potato-carrot-agar, six isolates of *Colletotrichum* were selected of fruits and leaves collected in the State of México and Michoacán. Three species of *Colletotrichum* were identified and molecularly analyzed, considering the asexual and sexual morphological structures, the differences in culture, the molecular identification of the genes rRNA by PCR-ITS and the pathogenicity tests. In fruits, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. orbiculare* were identified as causes of anthracnose, and *C. gloeosporioides* as causes of black spot and stem-end rot. In the leaf, *C. gloeosporioides* was found associated with symptoms of anthracnose. The identifications were confirmed molecularly and the sequences were deposited in the Gene Bank of the NCBI. The species *C. orbiculare*, along with the symptoms of anthracnose, black spot and stem-end rot constitute new phytosanitary reports in fruits and leaves of chirimoya.

**Key words:** Anthracnose, black spot, stem-end rot.

### INTRODUCTION

In tropical and subtropical regions, *Colletotrichum* causes anthracnose in cereals, fruit trees, vegetables, legumes and grasses (Freeman, 2000). In fruit trees, other symptoms are: descendent death of young branches in citrus (*Citrus* spp.), flower blight in mango (*Mangifera indica* L.), and crown rot in banana (*Musa* spp.) (Waller, 1992). Various species of *Colletotrichum* can infect the same host plant, such as in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.), where *C. acutatum* Simmonds ex Simmonds, *C. fragariae* Brooks and *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. cause rot in fruits, runners, leaves and petioles (Smith and Black, 1990; Gunnell and Gubler, 1992). In citrus, *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* cause the falling of small fruits, leaf spots and post-harvest rotting (Zulfiqar *et al.*, 1996). A single species of *Colletotrichum* can infect

*acutatum* y *C. gloeosporioides* ocasionan caída de frutos pequeños, manchas foliares y pudriciones en postcosecha (Zulfiqar *et al.*, 1996). Una misma especie de *Colletotrichum* puede infectar a más de un cultivo, como *C. gloeosporioides*, patógeno de postcosecha que infecta aguacate (*Persea americana* Miller), mango, papaya (*Carica papaya* L.), plátano y otros cultivos (Dickman *et al.*, 1994; Ploetz, 1994; Prusky, 1994). En California y Florida, *C. gloeosporioides* y otras especies de *Colletotrichum* no identificadas causan antracnosis y pudrición de frutos en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) (Farr *et al.*, 1989). En Michoacán, este patógeno, además de inducir síntomas en frutos, también ocasiona antracnosis en hojas (Nava-Díaz *et al.*, 2000; Villanueva-Arce *et al.*, 2005). La producción nacional de chirimoya se da en huertos establecidos principalmente en Morelos (232 ha), Michoacán (157 ha) e Hidalgo (10 ha) (CEA, 2004), y en árboles dispersos en traspatio en el Estado de México.

Hay poca información de los problemas fitosanitarios en chirimoya, en particular de las enfermedades relacionadas con hongos, que es necesaria para establecer un buen manejo del cultivo que resulte en productos con calidad comercial competitivos en mercados internacionales. Por tanto, el objetivo de este estudio fue generar información sobre las especies de *Colletotrichum* asociadas con diferentes síntomas de enfermedad en frutos y hojas de chirimoya mediante la identificación y caracterización molecular de genes ribosomales rARN, con la hipótesis de que más de una especie de *Colletotrichum* causa antracnosis en este cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreos y síntomas

De julio a septiembre de 2003 se hicieron tres viajes a Coatepec Harinas, Estado de México y a Salvador Escalante, Michoacán. En campo se registró la incidencia de enfermedad en frutos de 1000 árboles, 10 frutos por árbol, seleccionados al azar. En cada localidad se recolectaron 25 frutos maduros e inmaduros con síntomas de antracnosis, pudrición de pedúnculo y mancha negra; y en Salvador Escalante, 25 hojas de chirimoya con síntomas de enfermedad. Los síntomas se caracterizaron visualmente y se registró la severidad de daño. En frutos, la severidad se determinó con una escala predefinida de 1 a 8 y transformada a porcentaje (0-50); y en hojas, calculando el área total enferma expresada en porcentaje.

### Identificación y patogenicidad

#### Aislamientos

De cada uno de los 25 frutos y hojas recolectadas, por muestreo y localidad, se tomaron tres trozos de tejido sintomático (600 trozos

more than one crop, such as *C. gloeosporioides*, post-harvest pathogen that infects avocado (*Persea americana* Miller), mango, papaya (*Carica papaya* L.), banana and other crops (Dickman, 1994; Ploetz, 1994; Prusky, 1994). In California and Florida, *C. gloeosporioides* and other unidentified species of *Colletotrichum* cause anthracnose and rotting of fruits in chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) (Farr *et al.*, 1989). In Michoacan, besides inducing symptoms in fruits, this pathogen causes anthracnose in leaves (Nava-Díaz *et al.*, 2000, Villanueva-Arce *et al.*, 2005). The national production of chirimoya is in orchards established mainly in Morelos (232 ha), Michoacán (157 ha) and Hidalgo (10 ha) (CEA, 2004), and in backyard trees in the State of México.

There is little information of the phytosanitary problems in chirimoya, in particular of the diseases related to fungi, which is necessary for establishing good crop management resulting in products with competitive commercial quality for international markets. Therefore, the objective of the present study was to generate information of the species of *Colletotrichum* associated with different symptoms of disease in fruits and leaves of chirimoya through the identification and molecular characterization of ribosomal RNA genes, with the hypothesis that more than one species of *Colletotrichum* causes anthracnose in this crop.

## MATERIALS AND METHODS

### Samplings and symptoms

From July to September of 2003, three trips were made to Coatepec Harinas, State of México and to Salvador Escalante, Michoacán. In the field, the incidence of disease was registered in fruits of 1000 trees, 10 fruits per tree, selected randomly. In each locality 25 ripe and unripe fruits were selected with symptoms of anthracnose, stem-end rot and black spot; and in Salvador Escalante, 25 leaves of chirimoya with disease symptoms were selected. The symptoms were characterized visually and the severity of the damage was recorded. In fruits, the severity was determined with a predetermined scale of 1 to 8 and transformed to percent (0-50); and in leaves, by calculating the total diseased area expressed in percent.

### Identification and pathogenicity

#### Isolates

From each one of the 25 fruits and leaves collected, per sampling and locality, three pieces of symptomatic tissue were taken (600 pieces in all), were disinfested with sodium hypochlorite at 1.5% for 3 min, then washed three times with sterile distilled

en total), se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 1.5% por 3 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron y sembraron en cajas Petri con papa-dextrosa-agar (PDA, Bioxon®). Después de 3 d a  $25 \pm 2$  °C en luz blanca continua (LBC) de lámparas de 40 W (480 nm) (Solar®), los aislamientos de *Colletotrichum* desarrollados se purificaron por cultivo monoconidial y preservaron a  $-85$  °C por suspensión de conidios en glicerol a 20%.

### Especies identificadas

De cada aislamiento de *Colletotrichum* purificado se seleccionaron seis colonias representativas para su identificación, con base en sus estructuras morfológicas asexual (anamorfo) y sexual (teleomorfo). En aislamientos de 10 d de edad (dd) se seleccionaron al azar 50 estructuras asexuales: conidios, setas y apresorios. De cada estructura se registró la forma, el color y el tamaño ( $\mu\text{m}$ ). Para inducir la formación de apresorios se colocó una gota de agua destilada estéril con conidios en un portaobjeto y se incubó a temperatura ambiente (Villanueva-Arce *et al.*, 2005). De cultivos de 14 a 20 d se seleccionaron 50 peritecios (estructuras sexuales) y se caracterizó la forma, el color y el tamaño de 50 ascosporas, de cada uno. La identificación del anamorfo se hizo con: para género con las claves de Barnett y Hunter (1998); para especie con las de Sutton (1980, 1992) y referencias descriptivas de diversos autores; y la del teleomorfo con la descripción de Mordue (1971).

### Pruebas de patogenicidad

Con cada especie identificada se inocularon, sin herida, cuatro frutos inmaduros y sanos de chirimoya variedad Concha Lisa. Para esto se depositó una gota de 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril con  $1 \times 10^5$  conidios (obtenidos de colonias 8 dd) sobre la superficie de cada fruto, lavado y desinfectado con hipoclorito de sodio a 1.5% por 3 min. Como testigo hubo cuatro frutos inoculados con 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Después de la inoculación, los frutos se colocaron en cámara húmeda a 25 °C. A los 10 d, se midió el diámetro y la profundidad del tejido infectado y se hicieron reaislamientos en cultivo puro para su identificación.

### Diferencias en cultivo entre aislamientos

Durante el cultivo de aislamientos (tratamientos) de *Colletotrichum* se evaluó velocidad de crecimiento, forma de la colonia y esporulación para su caracterización cultural (cultivo). El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial: 6 aislamientos (MEX-1, MEX-2, MEX-3, MICH-1, MICH-2 y MICH-3), 2 medios de cultivo [PDA y PCA (papa-zanahoria-agar, 20 g L<sup>-1</sup>)] y 5 condiciones de incubación [I, II y III en LBC y temperatura de  $27 \pm 1$ ,  $25 \pm 3$ , y  $21 \pm 1$  °C; y, IV y V en luz negra continua (LNC) de lámparas de 40 W (365 nm) (Solar®) y  $25 \pm 3$  y  $21 \pm 1$  °C]; y 4 repeticiones por tratamiento. Cada tercer día y hasta el llenado del medio con crecimiento del hongo, se midió el diámetro de colonia (cm), se registró el tipo de micelio aéreo o raso, y el color por el anverso y reverso de la caja.

water, and dried and plated in Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA, Bioxon®). After 3 d at  $25 \pm 2$  °C in continuous white light (CWL) of 40 W lamps (480 nm) (Solar®), the developed isolates of *Colletotrichum* were purified by monoconidial culture and preserved at  $-85$  °C by suspension of conidia in glycerol at 20%.

### Identified species

From each *Colletotrichum* isolate purified, six representative colonies were selected for identification, based on their asexual (anamorph) and sexual (teleomorph) morphological structures. In 10 d old isolates (dd), 50 asexual structures were randomly selected: conidia, setae and appressoria. From each structure the form, colour and size ( $\mu\text{m}$ ) were recorded. To induce the appressoria formation, a drop of sterile distilled water with conidia was placed on a slide and was incubated at room temperature (Villanueva-Arce *et al.*, 2005). From cultures of 14 to 20 d, 50 perithecia (sexual structures) were selected, and the form, colour and size of 50 ascospores were characterized from each one. The anamorph identification was made with the following: for genus, with the keys of Barnett and Hunter (1998); for species, with those of Sutton (1980, 1992) and descriptive references of diverse authors; and that of the teleomorph with the description of Mordue (1971).

### Pathogenicity tests

With each identified species, four unripe and healthy fruits of cherimoya Concha Lisa variety, free of lesions, were innoculated. For this purpose a drop of 50  $\mu\text{L}$  of sterile distilled water was deposited with  $1 \times 10^5$  conidia (obtained from colonies 8 dd) on the surface of each fruit, washed and disinfested with sodium hypochlorite at 1.5% for 3 min. As control, there were four fruits inoculated with 50  $\mu\text{L}$  of sterile distilled water. After inoculation, the fruits were placed in a moist chamber at 25 °C. At 10 d, the diameter and depth of the infested tissue were measured, and re-isolations were made in pure culture for their identification.

### Differences in culture among isolates

During the culture of *Colletotrichum* isolates (treatments), an evaluation was made of growth rate, colony form and sporulation for their cultural characterization (culture). The design was completely randomized in a factorial arrangement: six isolates (MEX-1, MEX-2, MEX-3, MICH-1, MICH-2 and MICH-3), two culture media [PDA and PCA (potato-carrot-agar, 20 g L<sup>-1</sup>)] and five conditions of incubation [I, II and III in CWL and temperature of  $27 \pm 1$ ,  $25 \pm 3$ , and  $21 \pm 1$  °C; and, IV and V in continuous black light (CBL) of lamps of 40 W (365 nm) (Solar®) and  $25 \pm 3$  and  $21 \pm 1$  °C]; and four replicates per treatment. Every three days and until the medium was filled with fungal growth, the colony diameter (cm) was measured, and the type of aerial or non-aerial mycelia was registered, along with the colour of the obverse and reverse of the dish.

### Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza con los datos y una prueba de comparación de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) usando SAS (1988).

### Caracterización molecular

De los 6 aislamientos se obtuvieron cultivos monoconidiales para extraer ADN de micelio producido en caldo de papa (200 g papa, 20 g dextrosa y 1000 mL agua destilada) y en agitación constante a 200 rpm por 72 h. La extracción de ADN se hizo de acuerdo a Ahrens y Seemüller (1992), la evaluación de la calidad por electroforesis en gel de agarosa (Ultrapure, Gibco, USA) a 1%, y la cuantificación en un espectrofotómetro Perkin Elmer® (Lambda BIO 10). Para la amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2 se usaron los iniciadores universales ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción de PCR constó de: agua ultrapura estéril, 13.22  $\mu$ L; solución amortiguadora 1X, 2.5  $\mu$ L;  $MgCl_2$  2.5 mM, 2.08  $\mu$ L; dNTPs 0.2 mM, 2  $\mu$ L; iniciadores ITS1 e ITS4 20  $\rho$ Mol cada uno, 2  $\mu$ L por iniciador; Taq-DNA polimerasa 1 U (Biotecnologías Universitarias®), 0.2  $\mu$ L; y muestra problema de ADN 80 ng, 1  $\mu$ L, con volumen final de 25  $\mu$ L. La reacción se efectuó en un termociclador Perkin-Elmer (Mod. CT 2400) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C, por 2 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C, por 1 min; alineamiento a 50 °C, por 30 s; extensión inicial a 72 °C por 2 min; y una extensión final a 72 °C por 10 min. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa (1%) y tñó con bromuro de etidio. El producto amplificado se visualizó en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD®). La purificación del fragmento amplificado se hizo con QIAquick® PCR Purification Kit, según el protocolo de la compañía. El producto se secuenció en dos direcciones (5'→3' y 3'→5') en un equipo ABI PRISM 3700®. La secuencia se analizó con el software Lasergene® 2001 Versión 5 (DNASTAR, 2001), y se alineó con la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI). De los valores cuantitativos generados, se consideró el de mayor valor y se generó un índice de similaridad con el programa de alineamiento para dos secuencias por "Martinez NW Method" de DNASTAR. El análisis filogenético de las secuencias se hizo con el programa MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics (Kumar *et al.*, 2004), el método de Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parameter, y considerando 5000 réplicas de Bootstrap; se incluyó, la secuencia NCBI con número de registro EF672242 como raíz. Las secuencias de estudio se depositaron en el Banco de Genes del NCBI.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntomas

En frutos se registraron síntomas de antracnosis, mancha negra y pudrición de pedúnculo. La antracnosis se caracterizó por presentar lesiones necróticas

### Statistical analysis

An analysis of variance was made with the data, along with a comparison of means test (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) using SAS (1988).

### Molecular characterization

From the six isolates, monoconidial cultures were obtained to extract DNA from mycelia produced in potato broth (200 g potato, 20 g dextrose and 1000 mL distilled water) and in constant agitation at 200 rpm for 72 h. The extraction of DNA was made according to Ahrens and Seemüller (1992), the evaluation of quality by electrophoresis in agarose gel (Ultrapure, Gibco, USA) at 1%, and the quantification in a Perkin Elmer® spectrophotometer (Lambda BIO 10). For the amplification of the internal regions ITS1 and ITS2, the universal primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) were used. The PCR reaction mixture consisted of: sterile ultrapure water, 13.22  $\mu$ L; buffer solution 1X, 2.5  $\mu$ L;  $MgCl_2$  2.5 mM, 2.08  $\mu$ L; dNTPs 0.2 mM, 2  $\mu$ L; primers ITS1 and ITS4 20  $\rho$ Mol each one, 2  $\mu$ L per primer; Taq-DNA polymerase 1 U (Biotecnologías Universitarias®), 0.2  $\mu$ L; and sample problem of DNA 80 ng, 1  $\mu$ L, with final volume of 25  $\mu$ L. The reaction took place in a Perkin-Elmer thermocycler (Mod. CT 2400) with the following program: an initial denaturing at 95 °C for 2 min; 30 cycles of denaturing at 95 °C for 1 min, annealing at 50 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 2 min; afterwards at 72 °C for 10 min as single final extension cycle. The PCR product was analyzed through electrophoresis in agarose gel (1%) and stained with ethidium bromide. The amplified product was visualized in a transluminator (Gel Doc 2000, BIO RAD®). The purification of the amplified fragment was made with QIAquick® PCR Purification Kit, according to the company protocol. The product was sequenced in two directions (5'→3' and 3'→5') with an ABI PRISM 3700® equipment. The sequence was analyzed with the software Lasergene® 2001 Version 5 (DNASTAR, 2001), and was aligned with the data base of the Gene Bank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Of the quantitative values generated, that of highest value was considered, and a similarity index was generated with the alignment program for two sequences for "Martinez NW Method" of DNASTAR. The sequence phylogenetic analysis was made with the program MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics (Kumar *et al.*, 2004), the Neighbor-Joining method, model Kimura 2-parameter, and considering 5000 replicates of Bootstrap; the NCBI sequence was included with registration number EF672242 as root. The studied sequences were deposited in the Gene Bank of the NCBI.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Symptoms

In fruits, symptoms of anthracnose, black spot and stem-end rot were registered. The anthracnose was characterized by presentation of circular or

circulares (diámetro 1 mm a 4 cm) o irregulares, por coalescencia, hundidas con bordes levantados, por hundimiento del tejido, y con masas de conidios salmón-naranja (Figura 1b) formando acérvulos (Figuras 1a, 1c 1d). En algunos frutos las lesiones se extendieron a la pulpa. La mancha negra se presentó como áreas oscuras en la epidermis, brillantes e irregulares y de tamaño variable (Figura 1e). La pudrición de pedúnculo consistió de lesiones necróticas circulares alrededor de la base del pedúnculo, sin bordes definidos, 2 cm de diámetro y con formación de masas naranja de conidios; el daño se extendió a la cáscara y la pulpa (Figura 1f). La mayor incidencia de enfermedad fue la antracnosis (85%) en Michoacán, seguida de pudrición de pedúnculo (10%) y mancha negra (3%); con grados de severidad de 17 a 46% (Cuadro 1). El alto porcentaje de incidencia y severidad de antracnosis en Michoacán podría relacionarse con el mayor número de huertos establecidos, la mayor densidad de árboles  $\text{ha}^{-1}$ , y el manejo del cultivo (CEA, 2004); en contraste, en el Estado de México la producción se da en árboles dispersos en traspatio y hubo un bajo porcentaje.

En fruto se encontró a *C. fragariae* y a *C. gloeosporioides* ocasionando antracnosis en Michoacán y en el Estado de México. Farr *et al.* (1989) reportaron sólo a *C. gloeosporioides* como el agente causal de antracnosis en frutos cultivados en EE.UU.; y Nava-Díaz *et al.* (2000) reportaron a *C. gloeosporioides* como el agente causal de un síntoma similar a mancha negra en hojas de chirimoya en Michoacán. Sin embargo, un análisis más detallado realizado en el presente estudio, indicó que este síntoma es en realidad antracnosis, por su típica sintomatología que presenta.

### Identificación y patogenicidad

#### Especies identificadas

De 150 frutos con síntoma de antracnosis recolectados en ambas localidades, se aislaron tres especies de *Colletotrichum*: *C. fragariae* (100%), *C. gloeosporioides* (40%) y *C. orbiculare* (100%) (Cuadro 1). Sin embargo, *C. orbiculare* se aisló de material del Estado de México y *C. fragariae* de Michoacán. Probablemente *C. orbiculare* y *C. fragariae* correspondan a alguna de las especies reportadas para *Colletotrichum* spp. por Farr *et al.* (1989). Hasta 1992, el único hospedante consignado de *C. fragariae* era fresa (Gunnell y Gubler, 1992), pero Villanueva-Arce *et al.* (2005) reportaron a esta especie en chirimoya. En hojas sólo se aisló a *C. gloeosporioides* (100%), especie asociada también con mancha negra (42%) y pudrición de pedúnculo (100%).

irregular necrotic lesions (diameter 1 mm to 4 cm), by coalescence, sunken with raised edges, by sinking of the tissue, and with salmon-orange colored masses of conidia (Figure 1b) forming acervuli (Figures 1a, 1c and 1d). In some fruits the lesions extended to the pulp (flesh). The black spot appeared as dark areas in the epidermis, shiny and irregular and of varying size (Figure 1e). The stem-end rot consisted of circular necrotic lesions around the peduncle base, without defined edges, 2 cm in diameter and with formation of orange conidia masses; the damage extended to the rind and the pulp (Figure 1f). The highest incidence of disease was anthracnose (85%) in Michoacán, followed by stem-end rot (10%) and black spot (3%); with symptoms severity degrees of 17 to 46% (Table 1). The high percentage of incidence and severity of anthracnose in Michoacán could be related to the higher number of established orchards, the higher density of trees  $\text{ha}^{-1}$ , and the crop management (CEA, 2004); in contrast, in the State of México production takes place in disperse backyard trees and there was a low percentage.

In fruit, *C. fragariae* and *C. gloeosporioides* were found causing anthracnose in Michoacán and in the State of México. Farr *et al.* (1989) reported only *C. gloeosporioides* as the causal agent of anthracnose in fruits cultivated in the U.S.A; and Nava-Díaz *et al.* (2000) reported *C. gloeosporioides* as the causal agent of a symptom similar to black spot on chirimoya leaves in Michoacán. However, a more detailed analysis carried out in the present study, indicated that

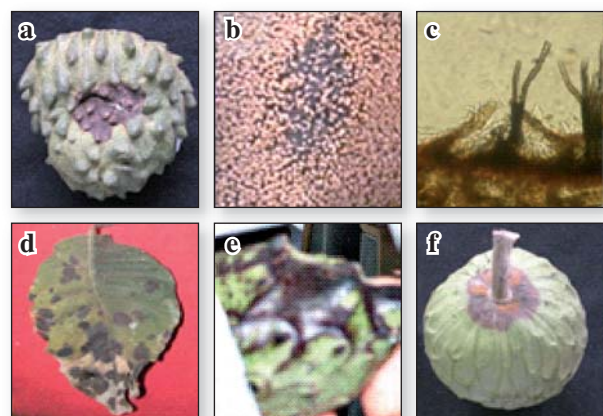


Figura 1. Síntomas y signos de *Colletotrichum* en materiales del Estado de México y Michoacán. Antracnosis en fruto y hoja (a, d), masas de conidios (b) producidos en acérvulo (c) sobre tejido infectado (a), mancha negra (e) y pudrición de pedúnculo (f).

Figure 1. Symptoms and signs of *Colletotrichum* in materials of the State of México and Michoacán. Anthracnose in fruit and leaf (a, d), masses of conidia (b) produced in acervuli (c) on infected tissue (a), black spot (e) and stem-end rot (f).

**Cuadro 1. Incidencia y severidad de síntomas de cada especie de *Colletotrichum* aislada de frutos y hojas de chirimoya, en localidades del Estado de México (MEX) y Michoacán (MICH).**

**Table 1. Incidence and severity of symptoms of each species of *Colletotrichum* isolated from fruits and leaves of chirimoya, in localities of the State of México (MEX) and Michoacán (MICH).**

Síntomas	Incidencia (%)	Severidad (%)	Aislamiento	%	Especie <sup>†</sup>
Antracnosis	5	25	MEX-1	40 <sup>¶</sup>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Antracnosis	3	17	MEX-2	100	<i>C. orbiculare</i>
Pudrición de pedúnculo	10	25	MEX-3	100	<i>C. gloeosporioides</i>
Mancha negra	3	32	MICH-1	42	<i>C. gloeosporioides</i>
				38	<i>Phomopsis</i> sp.
				11	<i>Alternaria</i> sp.
Antracnosis	85	46	MICH-2	100	<i>C. fragariae</i>
Antracnosis <sup>§</sup>	80	17	MICH-3	100	<i>C. gloeosporioides</i>

<sup>†</sup> En papa-dextrosa-agar. <sup>¶</sup> Sin colonias fungosas el resto de trozos de tejidos sembrados de frutos y hojas. <sup>§</sup> Sólo en hojas.

### Morfología de especies

Se encontraron diferencias y similitudes en las estructuras asexuales producidas por *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. orbiculare*. En general los conidios encontrados fueron hialinos, aseptados, cilíndricos y rectos, formando masas mucilaginosas de color salmón a naranja. Los conidios de *C. gloeosporioides*, presentaron extremos obtusos pero algunos angostados; los de *C. orbiculare*, con un extremo obtuso y otro angostado, al igual que los de *C. fragariae*. Sin embargo, en esta especie los conidios fueron menos anchos pero igual de largos que los del aislamiento MEX-3 de *C. gloeosporioides* (Cuadro 2, Figura 2c). En contraste los conidios de *C. orbiculare* fueron menos largos (Figura 2b).

Las setas formadas por *C. fragariae*, fueron fértiles y largas (hasta 290 µm) con producción apical de conidios (Figura 2c) (Gunnell y Gubler, 1992); en contraste,

this symptom is in fact anthracnose, because of the typical symptomatology that it presents.

### Identification and pathogenicity

#### Identified species

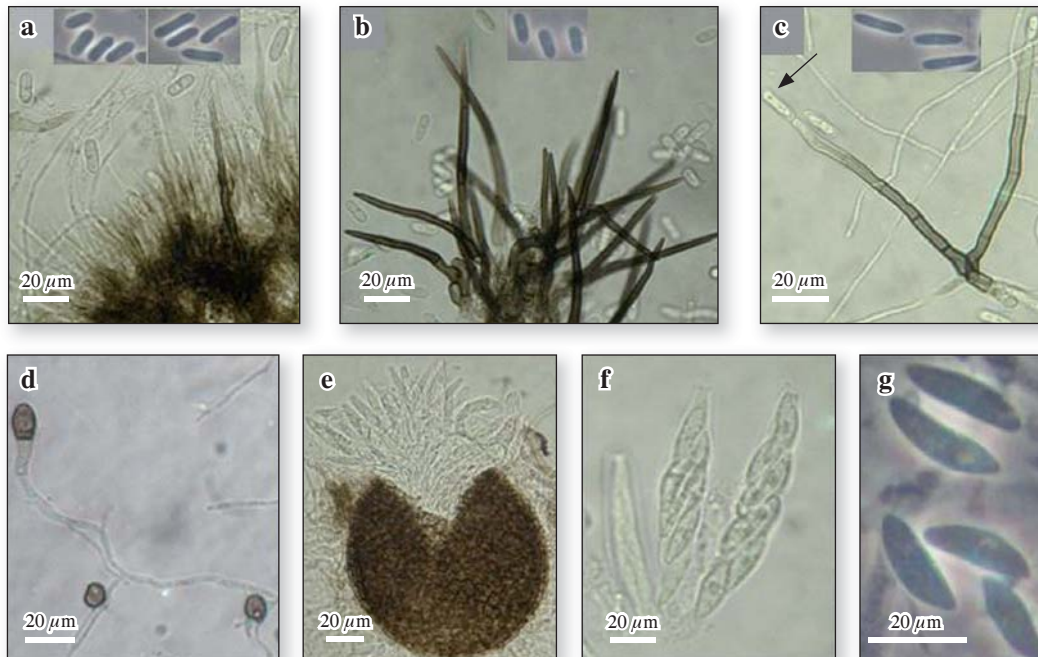
Of 150 fruits with anthracnose symptoms collected in both localities, three species of *Colletotrichum* were isolated: *C. fragariae* (100%), *C. gloeosporioides* (40%) and *C. orbiculare* (100%) (Table 1). However, *C. orbiculare* was isolated from material of the State of México and *C. fragariae* from Michoacán. Probably *C. orbiculare* and *C. fragariae* correspond to one of the species reported for *Colletotrichum* spp. by Farr *et al.* (1989). Until 1992, the only consigned host of *C. fragariae* was strawberry (Gunnell and Gubler, 1992), but Villanueva-Arce *et al.* (2005) reported this species in chirimoya. In leaves, only *C. gloeosporioides* was

**Cuadro 2. Características morfológicas de especies de *Colletotrichum* aisladas de frutos y hojas de chirimoya en los Estados de México (MEX) y Michoacán (MICH).**

**Table 2. Morphological characteristics of species of *Colletotrichum* isolated from fruits and leaves of chirimoya in the States of México (MEX) and Michoacán (MICH).**

Especie <sup>†</sup> /Aislamiento	Conidios	Setas	Apresorios	Referencias
<i>C. gloeosporioides</i>				
MEX-1	11.1-16.7×4.4-5.1	Escasas, ápices agudos, estériles, 1-2 septos. 11-50×3-4.4	Clavados, lobulados 4.4-13.3×4.4-10	Walker <i>et al.</i> , 1991; Gunnell y Gubler, 1992; Sutton, 1992.
MEX-3	13.3-20×4.4-5.6	----- <sup>¶</sup>	Clavados 5.6-15.5×4.4-7.8	
MICH-1	12.2-16.7×4.4-9	----- <sup>¶</sup>	Clavados, globosos ó lobulados 4.4-11.1×4.4-7.8	
MICH-3	12.2-17.8×4.4-4.9	Ápices agudos, estériles, 1-3 septos. 78-155×3.6-4	Irregulares, agrupados 6.7-13.3×6.7-11.1	
<i>C. fragariae</i>				
MICH-2	13.3-20×3.3-4.4	Ápice hialino, fértiles, 1-18 septos. 155-277 x 4-4.4	Clavados, lobulados ó irregulares 6.7-13.3×4.4-8.9	Gunnell y Gubler, 1992; Sutton, 1992.
<i>C. orbiculare</i>				
MEX-2	11.1-14.4×4-4.7	Ápices agudos, estériles, 1-2 septos. 55-100 x 3.3-4.4	Clavados 6.7-11.1×6.7-8.9	Walker <i>et al.</i> , 1991; Sutton, 1992.

<sup>†</sup> En cada uno se midieron, en µm, conidios, setas y apresorios (50 de cada estructura); los valores son rangos. <sup>¶</sup> No formaron setas.



**Figura 2.** Morfología comparativa de las especies identificadas de *Colletotrichum* y *Glomerella cingulata*. En *C. gloeosporioides*, conidios, conidióforos cortos en esporodocio y setas estériles (a); en *C. orbiculare*, conidios y setas estériles (b); y en *C. fragariae*, conidios en setas fértiles (flecha) (c) (papa-dextrosa-agar a 10 dd). En las tres especies, apresorios café (d) (3 dd en agua destilada estéril). En *G. cingulata*, peritecio oscuro, ascas y ascosporas hialinas (e, f, g) (papa-dextrosa-agar a 14-20 dd).

**Figure 2.** Comparative morphology of the identified species of *Colletotrichum* and *Glomerella cingulata*. In *C. gloeosporioides*, conidia, short conidiophores in sporodochium and sterile setae (a); in *C. orbiculare*, conidia and sterile setae (b); and in *C. fragariae*, conidia on fertile setae (arrow) (c) (potato-dextrose-agar at 10 dd). In the three species, brown appressoria (d) (3 dd in sterile distilled water). In *G. cingulata*, dark perithecia, asci and hyaline ascospores (e, f, g) (potato-dextrose-agar at 14-20 dd).

las de las otras dos especies fueron cortas (11-155  $\mu\text{m}$ ) y estériles (Figura 2a, b). Dos aislamientos de *C. gloeosporioides* no produjeron setas (Cuadro 2). Sutton (1992) menciona que no todos los aislamientos de *C. gloeosporioides* producen setas y que su formación está en función de la humedad relativa y de las condiciones de incubación del aislamiento. Por definición, las setas son hifas de crecimiento determinado, de pared gruesa, oscura y estériles (no producen conidios) (Kirk *et al.*, 2001). De acuerdo con los principios de conidiogénesis, las setas fértiles poseen una célula conidiogénica apical con un sólo lóculo conidiogénico en la punta (Figura 2c), a diferencia de las setas estériles (Figura 1a, b). Así, las setas no pueden considerarse como criterio taxonómico para aislamientos de *C. gloeosporioides* o para diferenciar *Colletotrichum* de *Gloeosporium* (otro género relacionado) (Sutton, 1992).

Los apresorios formados por las tres especies de *Colletotrichum* fueron café y de forma y tamaño similar, lo cual concuerda con Sutton (1980, 1992). Además, Walker *et al.* (1991) señalan que los apresorios no son determinantes en la identificación de estas tres especies (Cuadro 2).

isolated (100%), a species also associated with black spot (42%) and stem-end rot (100%).

### Morphology of species

Differences and similarities were found in the asexual structures produced by *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. orbiculare*. In general, the conidia found were hyaline, aseptate, cylindrical and straight, forming salmon to orange coloured mucilaginous masses. The conidia of *C. gloeosporioides* presented obtuse ends but some were tapered, those of *C. orbiculare*, with one obtuse end and the other tapered, as with those of *C. fragariae*. However, in this species the conidia were not as wide but were as long as those of the isolate MEX-3 of *C. gloeosporioides* (Table 2, Figure 2c). In contrast, the conidia of *C. orbiculare* were not as long (Figure 2b).

The setae formed by *C. fragariae* were fertile and long (up to 290  $\mu\text{m}$ ) with apical production of conidia (Figure 2c) (Gunnell and Gubler, 1992); in contrast, those of the other two species were short

En cuanto a las estructuras sexuales, sólo los aislamientos MEX-1 y MEX-3, de *C. gloeosporioides*, produjeron peritecios, café-oscuros, esféricos e inmersos, en PCA y PDA, a partir de los 5 dd y en todas las condiciones de incubación (Figura 2e). Por tanto, estos aislamientos se identificaron como *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, de acuerdo con las descripciones de Mordue (1971) y Uecker (1994). Los peritecios formaron ascosporas hialinas, unicelulares, curvadas y fusiformes a los 7-14 dd (Figura 2e, f, g).

Según Bombhe *et al.* (1988), algunos aislamientos de *C. gloeosporioides* son heterotálicos (requieren aparearse aislamientos compatibles), mientras que otros son homotálicos (autofértiles) y que las condiciones de incubación para producir peritecios varía entre aislamientos de la misma especie (Bryson *et al.*, 1992). Lo anterior explica el porqué no todos los aislamientos de *C. gloeosporioides* produjeron a *G. cingulata*. Sutton (1992) señala que en algunas especies de *Colletotrichum*, como *C. fragariae* y *C. orbiculare* se desconoce su teleomorfo.

### Pruebas de patogenicidad

De las tres especies aisladas, sólo *C. fragariae* y *C. orbiculare* resultaron patogénicas al reproducir los síntomas de enfermedad en frutos después de 10 d de inoculación; sin embargo, *C. fragariae* ocasionó lesiones más grandes (9×6 mm, diámetro por profundidad), que *C. orbiculare* (1×2 mm). Estas especies se reaislaron en cultivo puro. Posiblemente las condiciones de incubación no favorecieron el desarrollo de la enfermedad por *C. gloeosporioides*, pues se ha documentado su patogenicidad en frutos y hojas de chirimoya (Farr *et al.*, 1989; Nava-Díaz *et al.*, 2000). Esto se infiere porque en las mismas condiciones de incubación las otras dos especies resultaron patogénicas. En otros experimentos con objetivos diferentes (no señalados aquí), *C. fragariae* y *C. orbiculare* ocasionaron pudrición total del fruto; por tanto, se espera que frutos cosechados con alguna de las enfermedades ocasionadas por estas especies y en almacenaje inadecuado presenten pudrición total.

### Diferencias de cultivo entre aislamientos

Los tres factores evaluados para determinar la velocidad de crecimiento fueron significativos para aislamiento y condición de incubación ( $p \leq 0.001$ ), y para medio de cultivo ( $p \leq 0.005$ ). De todos los aislamientos, MICH-3 de *C. gloeosporioides* registró el mayor crecimiento, 35% más con respecto a

(11-155  $\mu\text{m}$ ) and sterile (Figure 2a, b). Two isolates of *C. gloeosporioides* did not produce setae (Table 2). Sutton (1992) mentions that not all of the isolates of some species of *C. gloeosporioides* produce setae, and that their formation is a function of the relative humidity and of the conditions of incubation of the isolate. By definition, setae are hyphae of determined growth, thick-walled, dark and sterile (they do not produce conidia) (Kirk *et al.*, 2001). According to the principals of conidiogenesis, the fertile setae possess an apical conidiogenic cell with a single conidiogenic locus on the tip (Figure 2c), contrary to the sterile setae (Figure 1a, b). Thus, the setae can not be considered as taxonomical criteria for isolates of *C. gloeosporioides* or to differentiate *Colletotrichum* from *Gloeosporium* (another related genus) (Sutton, 1992).

The appressoria formed by the three species of *Colletotrichum* were brown and of similar shape and size, which agrees with Sutton (1980, 1992). Furthermore, Walker *et al.* (1991) point out that the appressoria are not determinant in the identification of these three species (Table 2).

With respect to the sexual structures, only the isolates of MEX-1 and MEX-3, of *C. gloeosporioides*, produced dark brown, spherical and immersed perithecia, in PCA and PDA, after 5 dd and in all incubation conditions (Figure 2e). Therefore, these isolates were identified as *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, according to the descriptions of Mordue (1971) and Uecker (1994). The perithecia formed hyaline, unicellular, curved and fusiform ascospores at 7-14 dd (Figure 2e, f, g).

According to Bombhe *et al.* (1988), some isolates of *C. gloeosporioides* are heterothallic (they require compatible isolates to couple), whereas others are homothallic (autofertile) and that the conditions of incubation for producing perithecia vary among isolates of the same species (Bryson *et al.*, 1992). The above explains why not all the isolates of *C. gloeosporioides* produced *G. cingulata*. Sutton (1992) points out that in some species of *Colletotrichum*, such as *C. fragariae* and *C. orbiculare*, their teleomorph is unknown.

### Pathogenicity tests

Of the three species isolated, only *C. fragariae* and *C. orbiculare* were pathogenic because they reproduced the disease symptoms in fruits after 10 d of inoculation; however, *C. fragariae* caused larger lesions (9×6 mm, diameter by depth), than *C. orbiculare* (1×2 mm). These species were re-isolated in pure culture. Possibly the conditions of incubation



MEX-2 de *C. orbiculare* que tuvo el menor crecimiento; seguido, en orden decreciente de MICH-2 de *C. fragariae*, MEX-3, MEX-1 y MICH-1 de *C. gloeosporioides*, en igual tiempo de incubación (10 dd) (Cuadro 3). En PCA el crecimiento fue mayor (0.6 cm) que en PDA y en condición de luz blanca y negra, a 25 y 27 °C (condición I, II, IV), donde los aislamientos no fueron diferentes ( $p > 0.05$ ); en contraste, el menor crecimiento fue a  $21 \pm 1$  °C y luz negra (condición V). En general, la respuesta de crecimiento fue proporcional entre aislamientos a cada condición de incubación. Debido a que el valor en crecimiento de MICH-2 de *C. fragariae* no fue diferente ( $p > 0.05$ ) al de MEX-3 de *C. gloeosporioides*, el crecimiento no puede ser considerado como un factor de separación entre estas dos especies. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Smith y Black (1990) y Gunnell y Gubler (1992), quienes indican que la característica de crecimiento no es criterio suficiente para separar a estas dos especies.

En PDA, la forma de la colonia varió entre repeticiones, aislamientos, edad y condición de incubación (Figura 3). En *C. gloeosporioides* el micelio fue de raso o ligeramente aéreo, a denso y aéreo; y en *C. fragariae* y *C. orbiculare*, de poco denso a denso y aéreo. Las tres especies desarrollaron micelio, que al inicio fue blanco o blanquecino (según la condición de incubación) cambiando a salmón, salmón-naranja-rosa, gris o gris-olivo. En todas las condiciones probadas, MICH-2 de *C. fragariae* y MEX-1 de *C. gloeosporioides* formaron colonias oscuro intenso; MICH-1 de *C. gloeosporioides* colonias claras; y

did not favor the development of the disease by *C. gloeosporioides*, as its pathogenicity has been documented in fruits and leaves of cherimoya (Farr *et al.*, 1989; Nava-Díaz *et al.*, 2000). This is inferred because under the same conditions of incubation, the other two species were pathogenic. In other experiments with different objectives (not included here), *C. fragariae* and *C. orbiculare* caused total rotting of the fruit; therefore, it is expected that fruits harvested with any of the diseases caused by these species and in inadequate storage will present total rotting.

### Differences of culture among isolates

The three factors evaluated to determine the growth rate were significant for isolate and condition of incubation ( $p \leq 0.001$ ), and for culture medium ( $p \leq 0.005$ ). Of all of the isolates, MICH-3 of *C. gloeosporioides* registered the highest growth, 35% higher with respect to MEX-2 of *C. orbiculare*, which had the lowest growth; followed in decreasing order by MICH-2 of *C. fragariae*, MEX-3, MEX-1 and MICH-1 of *C. gloeosporioides*, in the same time of incubation (10 dd) (Table 3). In PCA the growth was higher (0.6 cm) than in PDA and under conditions of white and black light, at 25 and 27 °C (condition I, II, IV), where the isolates were not different ( $p > 0.05$ ); in contrast, the lowest growth was at  $21 \pm 1$  °C and black light (condition V). In general, the response of growth was proportional among isolates to each condition of incubation. Because the value in growth of MICH-2 of *C. fragariae* was not different ( $p > 0.05$ ) than

Cuadro 3. Comparación de medias del crecimiento en dos medios de cultivo y cinco condiciones de incubación de seis aislamientos de *Colletotrichum* spp. aislados de chirimoya en el Estado de México (MEX) y Michoacán (MICH).

Table 3. Comparison of means of the growth in two culture media and five incubation conditions of six isolates of *Colletotrichum* spp. isolated from cherimoya in the State of México (MEX) and Michoacán (MICH).

Factor	Especificaciones	Observaciones	Media (mm) <sup>¶</sup>
Aislamiento <sup>†</sup>	MICH-3 ( <i>C. gloeosporioides</i> )	40	79.6a
	MICH-2 ( <i>C. fragariae</i> )	40	75.6b
	MEX-3 ( <i>C. gloeosporioides</i> )	40	73.6bc
	MEX-1 ( <i>C. gloeosporioides</i> )	40	73.1c
	MICH-1 ( <i>C. gloeosporioides</i> )	40	63.8d
	MEX-2 ( <i>C. orbiculare</i> )	40	51.7e
Medio de cultivo	PCA <sup>§</sup>	120	66.0a
	PDA <sup>p</sup>	120	65.4b
Condición de incubación	I (LBC <sup>□</sup> , 27±1 °C)	48	75.7a
	IV (LNC <sup>††</sup> , 25±3 °C)	48	75.7a
	II (LBC, 25±3 °C)	48	74.4a
	III (LBC, 21±1 °C)	48	63.0b
	V (LNC, 21±1 °C)	48	59.0c

<sup>†</sup> De frutos y hojas, evaluados a 10 d de edad. <sup>¶</sup> Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ). <sup>§</sup> Papa-zanahoria-agar.

<sup>p</sup> Papa-dextrosa-agar. <sup>□</sup> Luz blanca continua. <sup>††</sup> Luz negra continua.

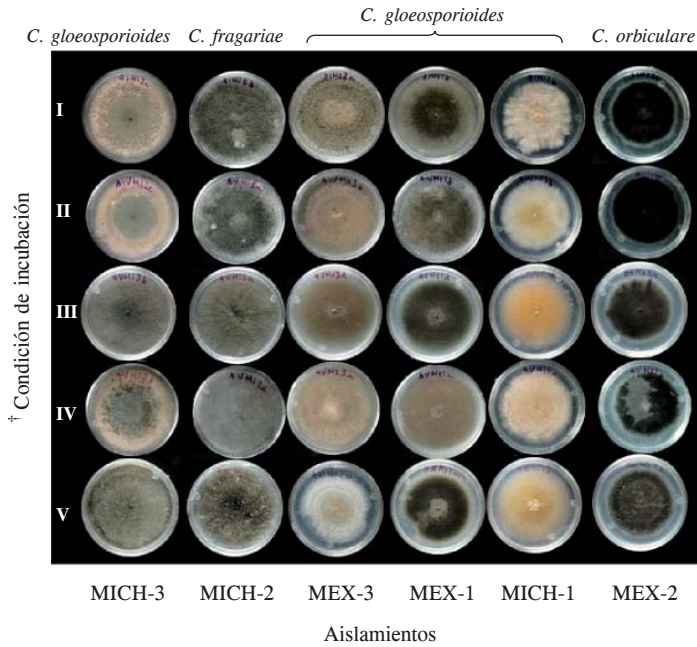


Figura 3. Características de la forma y color de colonias de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de 14 dd en papa-dextrosa-agar<sup>†</sup> y diferentes condiciones de incubación.

Figure 3. Characteristics of the form and colour of colonies of isolates of *Colletotrichum* spp. of 14 dd in potato-dextrose-agar<sup>†</sup> and different incubation conditions.

<sup>†</sup> Luz blanca continua a temperatura de: I=27±1, II=25±3, III=21±1 °C; y luz negra continua a IV=25±3 y V=21±1 °C.

<sup>‡</sup> En papa-zanahoria-agar las diferencias en cultivo fueron mínimas.

MEX-2 de *C. orbiculare*, colonias gris-oscuro a casi negro (Figura 3). En PCA la variación en el color de las colonias fue menor. La coloración de colonias se usa como un criterio para la caracterización de especies de *Colletotrichum* (Sutton, 1980, 1992). En este estudio, las colonias de MICH-2 de *C. fragariae* presentaron una coloración similar a la de MEX-1 de *C. gloeosporioides*. Esto indica, en parte, porque durante algún tiempo *C. fragariae* se consideró como sinónimo de *C. gloeosporioides* (Sutton, 1992).

En PCA se registró mayor esporulación (producción) de conidios que en PDA. Esta producción fue inicialmente en conidióforos en micelio aéreo y después en esporodocios de colonias jóvenes (3-5 dd) (Figura 2a). En MEX-1 y MEX-3 de *C. gloeosporioides* hubo escasa producción de conidios; sin embargo, estos aislamientos presentaron fase sexual, la cual se ha relacionado con la liberación de ciertas sustancias que inhiben la formación de conidios (Wheeler, 1956).

Las diferencias de cultivo obtenidas entre aislamientos de *C. gloeosporioides* son comunes en esta especie, considerada compleja, heterogénea y con gran variabilidad en medio de cultivo (Sutton, 1992). Los aislamientos de esta especie se han agrupado en al menos nueve formas por sus diferencias de cultivo (Sutton, 1980). En síntesis, la mejor respuesta de crecimiento de los aislamientos fue en PDA en las condiciones de incubación I, II, IV; sin embargo, todas las condiciones y ambos medios fueron adecuados para la formación del teleomorfo e indujeron esporulación. En PCA no hubo una clara diferenciación en las características de cultivo.

that of MEX-3 of *C. gloeosporioides*, growth can not be considered a factor of separation between these two species. These results agree with those reported by Smith and Black (1990) and Gunnell and Gubler (1992), who indicate that the growth characteristic is not sufficient criterion for separating these two species.

In PDA, the colony form varied among replicates, isolates, age and incubation conditions (Figure 3). In *C. gloeosporioides*, the mycelia went from non-aerial or slightly aerial, to dense and aerial; and in *C. fragariae* and *C. orbiculare*, from slightly dense to dense and aerial. The three species developed mycelia, which at the onset was white or whitish (according to the incubation condition) changing to salmon, salmon-orange-pink, gray or gray-olive. Under all of the conditions tested, MICH-2 of *C. fragariae* and MEX-1 of *C. gloeosporioides* formed intensely dark colonies, MICH-1 of *C. gloeosporioides* clear colonies; and MEX-2 of *C. orbiculare*, dark-gray to almost black colonies (Figure 3). In PCA the variation in the colour of the colonies was lower. The coloration of colonies is used as a criterion for the characterization of species of *Colletotrichum* (Sutton, 1980, 1992). In this study, the colonies of MICH-2 of *C. fragariae* presented a coloration similar to that of MEX-1 of *C. gloeosporioides*. This indicates, in part, the reason that for some time *C. fragariae* was considered to be synonymous with *C. gloeosporioides* (Sutton, 1992).

In PCA, higher sporulation of conidia (production) was registered than in PDA. This production was initially in conidiophores in aerial mycelia and later in

### Caracterización molecular

Las secuencias de MEX-1, MEX-3, MICH-1 y MICH-3 de *C. gloeosporioides*, MICH-2 de *C. fragariae*, y MEX-2 de *C. orbiculare* se alinearon con las secuencias de estas mismas especies depositadas en el Banco de Genes del NCBI (Cuadro 4). Con excepción de MICH-3, el índice de similaridad de nucleótidos entre las secuencias de los aislamientos de *Colletotrichum* de este estudio, respecto al de las especies alineadas en el Banco de Genes, fue 99.6 a 100%; para MICH-3 fue 97.6%. El árbol filogenético mostró la agrupación de todas las secuencias de *Colletotrichum* en una rama y la secuencia de *Gloeosporium* (usada como raíz) en otra (Figura 4). Las secuencias de *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, y *C. orbiculare* estuvieron en diferentes subramas, reafirmando la identificación de las tres especies de *Colletotrichum* (Figura 4). Las secuencias de MEX-1, MEX-3 y MICH-1 de

sporodochia of young colonies (3-5 dd) (Figure 2a). In MEX-1 and MEX-3 of *C. gloeosporioides*, there was scarce production of conidia; however, these isolates presented sexual phase, which has been related with the release of certain substances that inhibit the formation of conidia (Wheeler, 1956).

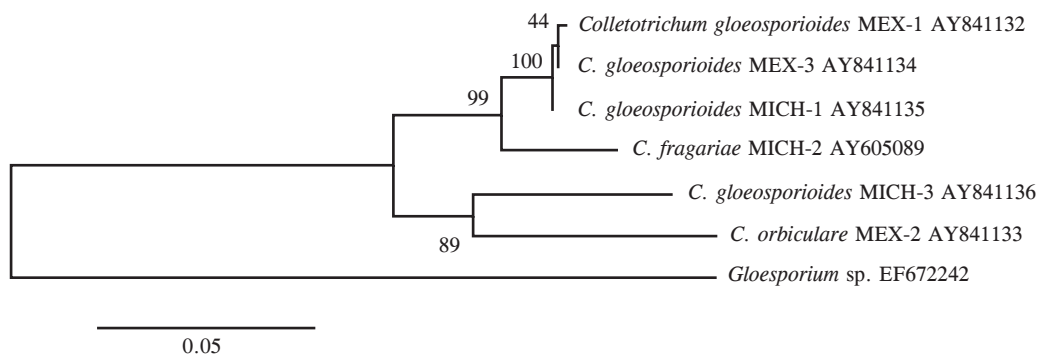
The culture differences obtained among isolates of *C. gloeosporioides* are common in this species, considered complex, heterogeneous and with great variability in culture media (Sutton, 1992). The isolates of this species have been grouped in at least nine forms by their culture differences (Sutton, 1980). In synthesis, the best growth response of the isolates was in PDA under the incubation conditions I, II, IV; however, all of the conditions and both media were adequate for the formation of the teleomorph and induced sporulation. In PCA, there was not a clear differentiation in the characteristics of culture.

**Cuadro 4.** Análisis de la región ITS y los genes rARN de especies de *Colletotrichum* aisladas de frutos y hojas de chirimoya en los Estados de México (MEX) y Michoacán (MICH).

**Table 4.** Analysis of the region ITS and the genes rRNA of *Colletotrichum* species isolated from fruits and leaves of chirimoya in the States of México (MEX) and Michoacán (MICH).

Aislamiento	Identificación <sup>†</sup>	Especie alineada <sup>‡</sup> (registro NCBI) <sup>§</sup>	Número de nucleótidos	Similaridad <sup>p</sup> (%)	Valor de alineamiento
MEX-1	<i>C. gloeosporioides</i> , AY841132	<i>C. gloeosporioides</i> , AY266377	559	99.8	763
MEX-2	<i>C. orbiculare</i> , AY841133	<i>C. orbiculare</i> , ABO42309	545	99.8	1031
MEX-3	<i>C. gloeosporioides</i> , AY841134	<i>C. gloeosporioides</i> , AY266377	559	100.0	817
MICH-1	<i>C. gloeosporioides</i> , AY841135	<i>C. gloeosporioides</i> , AY266377	549	100.0	1088
MICH-2	<i>C. fragariae</i> , AY605089	<i>C. fragariae</i> , AJ301912	528	99.8	997
MICH-3	<i>C. gloeosporioides</i> , AY841136	<i>C. gloeosporioides</i> , AJ301979	545	97.6	977

<sup>†</sup> Con número de depósito en el NCBI. <sup>‡</sup> Por el software de Lasergene 2001 V.5 (DNASTAR, Inc. Madison, California, USA). <sup>§</sup> Banco de genes del National Center for Biotechnology Information. <sup>p</sup> Valores generados por el programa de DNASTAR.



**Figura 4.** Árbol filogenético de las secuencias de las regiones ITS de aislamientos de *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. orbiculare* de frutos y hojas de chirimoya. Árbol construido con el programa MEGA 4 software, método de Neighbor-Joining, modelo Kimura 2-parameter y 5000 réplicas de Bootstrap. Se incluyó como raíz a *Gloeosporium* sp. con número de secuencia EF672242.

**Figure 4.** Phylogenetic tree of the sequences of the ITS regions of isolates of *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. orbiculare* of fruits and leaves of chirimoya. Tree constructed with the program MEGA 4 software, method of Neighbor-Joining, model Kimura 2-parameter and 5000 replicates of Bootstrap. *Gloeosporium* sp. was included as root with sequence number EF672242.

*C. gloeosporioides* (aislamientos de frutos) se ubicaron en una misma subrama (100% Bootstrap); la de MICH-3 de *C. gloeosporioides* (aislamiento de hojas), en otra subrama, junto con MEX-2 de *C. orbiculare* (89% de Bootstrap). Debido a que MICH-3 de *C. gloeosporioides* mostró diferencias en cultivo, se diferenció molecularmente de los otros tres aislamientos de su misma especie y se aisló sólo de hojas; MICH-3 se propone como una forma diferente del resto de los aislamientos de *C. gloeosporioides*. Como ya se indicó, estas diferencias están acorde con la gran variabilidad mostrada por *C. gloeosporioides* en caracteres de cultivo (culturales), morfología, patogenicidad y rango de hospedantes (Sutton, 1980). El árbol filogenético también mostró que genéticamente *Gloeosporium* y *Colletotrichum* son géneros totalmente diferentes.

### CONCLUSIONES

Más de una especie de *Colletotrichum* se encontró como causantes de enfermedades en el cultivo de chirimoya. En frutos con síntomas de antracnosis se aisló e identificó a *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* y *C. orbiculare*. La especie *C. gloeosporioides* también se aisló de frutos con síntomas de mancha negra y pudrición de pedúnculo; y de hojas con síntomas de antracnosis. Las identificaciones se corroboraron molecularmente y las secuencias se depositaron en el Banco de Genes del NCBI. Este estudio de *C. orbiculare*, así como los síntomas de antracnosis, mancha negra y pudrición de pedúnculo, constituyen nuevos reportes fitosanitarios en frutos y hojas de chirimoya.

### LITERATURA CITADA

- Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4<sup>th</sup> edition. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Bombhe, B. B., S. R. Potdukhe, and J. G. Raut. 1988. Perithecial development by the isolates of *Colletotrichum*. *Indian Phytopathol.* 41: 627-628.
- Bryson, R. J., C. E. Caten, D. W. Hollomon, and J. A. Bailey. 1992. Sexuality and genetics of *Colletotrichum*. In: Bailey, J. A., and M. J. Jeger (eds). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International. Wallingford, UK. pp: 27-46.
- CEA (Centro de Estadística Agropecuaria). 2004. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON) V. 1.1: <http://www.siea.sagarpa.gob.mx:80//sistemas/siacon/SIACON.html> (consultado en enero, 2008).
- Dickman, M. B. 1994. Anthracnose. In: Ploetz, R. C., G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr (eds). *Papaya Diseases Caused by Fungi. Compendium of Tropical Fruit Diseases*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp: 58-59.

### Molecular characterization

The sequences of MEX-1, MEX-3, MICH-1 and MICH-3 of *C. gloeosporioides*, MICH-2 of *C. fragariae*, and MEX-2 of *C. orbiculare* were aligned with the sequences of these same species deposited in the Gene Bank of the NCBI (Table 4). With the exception of MICH-3, the index of similarity of nucleotides among the sequences of the isolates of *Colletotrichum* of this study, with respect to that of the other species aligned in the Gene Bank, was 99.6 to 100%; for MICH-3 it was 97.6%. The phylogenetic tree showed the grouping of all of the sequences of *Colletotrichum* in one branch and the sequence of *Gloeosporium* (used as root) in another (Figure 4). The sequences of *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, and *C. orbiculare* were in different sub-branches, reaffirming the identification of the three species of *Colletotrichum* (Figure 4). The sequences of MEX-1, MEX-3, MICH-1 of *C. gloeosporioides* (fruit isolates) were in a same sub-branch (100% Bootstrap), and MICH-3 of *C. gloeosporioides* (leaves isolate), in another sub-branch, along with MEX-2 of *C. orbiculare* (89% of Bootstrap). Because MICH-3 of *C. gloeosporioides* showed differences in culture, it was molecularly differentiated from the other three isolates of its same species and was isolated only from leaves; MICH-3 is proposed as a different form from the rest of the isolates of *C. gloeosporioides*. As mentioned before, these differences are a typical variability of *C. gloeosporioides* isolates in characters of culture (cultural), morphology, pathogenicity and range of hosts (Sutton, 1980). The phylogenetic tree also showed that genetically *Gloeosporium* and *Colletotrichum* are totally different genera.

### CONCLUSIONS

More than one species of *Colletotrichum* was found as cause of diseases in the chirimoya crop. In fruits with symptoms of anthracnose, *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* and *C. orbiculare* were isolated and identified. The species *C. gloeosporioides* also was isolated in fruits with symptoms of black spot and stem-end rot; and of leaves with symptoms of anthracnose. The identifications were molecularly corroborated and the sequences were deposited in the Gene Bank of the NCBI. This study of *C. orbiculare*, along with the symptoms of anthracnose, black spot and stem-end rot, constitute new phytosanitary reports in fruits and leaves of chirimoya.

—End of the English version—



- DNASTAR, 2001. Lasergene. Expert Sequence Analysis Software. User's Manual. Versión 5. DNASTAR, Inc. Madison, Wisconsin, USA. 475 p.
- Farr, D. F., G. F. Bills, G. P. Chamuris, and A. Y. Rossman. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 1252 p.
- Freeman, S. 2000. Genetic diversity and host specificity of *Colletotrichum* species on various fruits. In: Prusky, D. S. Freeman and M. Dickman (eds). *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA. pp: 131-144.
- Gunnell, P. S., and W. D. Gubler. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia* 84: 157-165.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, J. C. David, and J. A. Stalpers. 2001. Dictionary of the Fungi. CAB International. Oxon, UK. 655 p.
- Kumar, S, K. Tamura, and M. Nei. 2004. Mega 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Mordue, J. E. M. 1971. *Glomerella cingulata*. In: C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 315. Commonwealth Agriculture Bureaux. The Eastern Press. Great Britain, U. K. 2 p.
- Nava-Díaz, C., S. Osada-Kawasoe, G. Rendón-Sánchez, y V. Ayala-Escobar. 2000. Organismos asociados a chirimoyo (*A. cherimola* Mill.) en Michoacán, México. *Agrociencia* 34: 217-226.
- Ploetz, R. C. 1994. Anthracnose. In: Ploetz, R. C., G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr (eds). Mango disease caused by fungi. *Compendium of Tropical Fruit Diseases*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. pp: 35-36.
- Prusky, D. 1994. Anthracnose. In: Ploetz, R. C., G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr (eds). Avocado. *Compendium of Tropical Fruit Diseases*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. pp: 72-73.
- SAS (Statistical Analysis System). 1988. SAS User's Guide: Statistics. Release 6.03. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina, USA. 1028 p.
- Smith, B. J., and L. L. Black. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.* 74: 69-76.
- Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Picnidia, Acervuli and Stromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 696 p.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey J. A., and M. J. Jeger (eds). *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International. Wallingford, UK. pp: 1-26.
- Uecker, F. A. 1994. Ontogeny of the ascoma of *Glomerella cingulata*. *Mycologia* 86: 82-88.
- Villanueva-Arce, R., A. M. Hernández-Anguiano, M. J. Yáñez-Morales, D. Téliz-Ortiz, A. Mora-Aguilera, E. Cárdenas-Soriano, y A. Castañeda-Vildózola. 2005. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. *Agrociencia* 39: 93-106.
- Walker, J., A. Nikandrow, and G. D. Millar. 1991. Species of *Colletotrichum* on *Xanthium* (Asteraceae) with comments on some taxonomic and nomenclatural problems in *Colletotrichum*. *Mycological Res.* 95: 1175-1193.
- Waller, J. M. 1992. *Colletotrichum* diseases of perennial and other cash crops. In: Prusky, D., S. Freeman, and M. Dickman (eds). *Colletotrichum Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. pp: 167-185.
- Wheeler, H. E. 1956. Sexual versus asexual reproduction in *Glomerella*. *Mycologia* 48: 349-353.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego, California, USA. pp: 315-322.
- Zulfiqar, M., R. H. Brlansky, and L. W. Timmer. 1996. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia* 88: 121-128.