

DIVERSIDAD GENÉTICA, PATOGENICA Y MORFOLÓGICA DEL HONGO *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) DE MICHOACÁN, MÉXICO*

GENETIC, PATHOGENIC AND MORPHOLOGICAL DIVERSITY OF FUNGI *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) FROM MICHOACAN, MEXICO

Víctor Montero Tavera^{1§}, José Luciano Morales García², Mario Martín González Chavira¹, José Luis Anaya López¹, Tarsicio Corona Torres³ y Amanda Gálvez Mariscal⁴

¹Campo Experimental Bajío. INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km 6.5. Celaya, Guanajuato, México. A. P. 112. C. P. 38110. Tel. 01 461 6115323. (mgchavira@msn.com), (jose.luis.al@hotmail.com). ²Campo Experimental Uruapan, INIFAP. Av. Latinoamericana 1101, colonia Revolución, Uruapan, Michoacán. C. P. 60150. Tel. 01 452 5237392. (cefapuru@prodigy.net.mx). ³Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Posgraduados. Carretera México- Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Tel. 01 55 58045957. (tcoronat@colpos.mx). ⁴Facultad de Química. UNAM. Ciudad Universitaria, Distrito Federal, México. Tel. 01 55 56166816. (galvez@unam.mx). [§]Autor para correspondencia: montero.victor@inifap.gob.mx.

RESUMEN

El hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, es el agente causal de antracnosis y representa la principal limitante para la cosecha de frutos con calidad comercial de aguacate Hass (*Persea americana*). La diversidad genética poblacional de este hongo se ha estudiado en diversas partes del mundo, pero en México se desconoce su estructura poblacional y particularmente los componentes de su diversidad. Se determinó la diversidad genética, patogénica y morfológica de 21 cepas monoconidiales de *Colletotrichum gloeosporioides* de Michoacán, México. La diversidad genética se estimó por medio del polimorfismo de ADN amplificado al azar y por la determinación de los perfiles de isoenzimas de cada cepa monoconidiales. La diversidad patogénica se midió mediante la capacidad invasiva de pulpa de aguacate y por la tasa de crecimiento *in vitro*. La diversidad morfológica *in vitro* se determinó por la comparación de caracteres del micelio de cada cepa monoconidiales. Los resultados mostraron alta diversidad de *Colletotrichum gloeosporioides* con un índice de variabilidad genética de 0.3031 y los estimadores más precisos fue el polimorfismo de ADN amplificado al azar (índice de variabilidad genética igual a 0.344) y perfiles de isoenzimas (índice de variabilidad genética igual a 0.35). Las características típicas fueron micelio blanco, consistencia algodonosa, colonia blanca, crecimiento de micelio al

ABSTRACT

The fungi *Colletotrichum gloeosporioides*, is the agent that causes anthracnose and the main limitation to the harvest of commercial quality Hass avocado (*Persea americana*). The genetic diversity of the population of this fungus has been studied in several parts of the world, yet in Mexico, its population structure, and especially the components of its diversity, are unknown. The genetic, pathogenic and morphological diversity was determined for 21 monoconidial strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from Michoacán, Mexico. The genetic diversity was estimated by means of random amplified DNA polymorphism, and by determining the profiles of isoenzymes of each monoconidial strain. Pathogenic diversity was measured with the invasive capacity of avocado pulp and the growth rate *in vitro* was determined by comparing the characteristics of the mycelia of each monoconidial strain. Results showed a high diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* with a genetic variability index of 0.3031, and the most accurate estimator was the random amplified DNA polymorphism (genetic variability index= 0.344) and isoenzyme profile (genetic variability index= 0.35). The typical characteristics were white mycelia, cotton-like consistency, white colony, random mycelia growth and short hyphae on the

* Recibido: mayo de 2009
Aceptado: enero de 2010

azar e hifas cortas en el borde de crecimiento. No se encontró relación entre la patogenicidad medida como capacidad invasiva de pulpa y la velocidad de crecimiento *in vitro*. Los análisis de agrupamiento establecieron que las relaciones entre cepas se dan principalmente con base en la localidad de origen y de manera secundaria, en el síntoma producido en el fruto.

Palabras clave: *Persea americana*, análisis de agrupamiento, isoenzimas, RAPD.

INTRODUCCIÓN

En México el cultivo del aguacate (*Persea americana* cv. Hass) es muy importante para la economía nacional, debido a que se mantienen en promedio 118 000 hectáreas sembradas con producción anual promedio de 1 150 000 t y rendimiento de 10.5 t ha⁻¹ y exportaciones hasta de 260 000 t (Colín, 2009). El estado de Michoacán cuenta con el 90% de la superficie nacional sembrada, siendo el primer productor en el ámbito mundial; los municipios más importantes de la franja aguacatera del estado son: Peribán, Uruapan, Tancítaro, San Juan Nuevo, Tacámbaro, Ario de Rosales, Tingüindín, Zitácuaro, Atapan, Salvador Escalante y Ziracuaretiro. Uno de los factores más importantes que limitan la producción, abatiéndola hasta 70%, es la presencia de enfermedades fungosas; de las cuales, la más importante por el daño económico que causa es la antracnosis, que se reconoce por diversos síntomas tales como cuarteaduras, manchas y viruela.

La antracnosis se caracteriza por presentar lesiones oscuras y hundidas, circulares o elipsoidales, con grandes cantidades de esporas formando masas compactas de color salmón, naranja o rosadas. El agente causal de esta enfermedad es el hongo ascomiceto *Colletotrichum gloeosporioides* (Binyamini y Schiffmann-Nadel, 1972). En Michoacán la antracnosis se presenta en todos los municipios productores de aguacate y ataca al aguacate desde la etapa de formación de frutos hasta su traslado, almacenaje y comercialización (Morales y Vidales, 1994). La entrada del hongo al fruto puede producirse antes de la maduración y manifestar los daños cuando éste madura, fenómeno que es posible ya que la muerte celular no es una condición necesaria para la patogénesis por *C. gloeosporioides* (Nesher *et al.*, 2008); además este proceso es modulado por el pH de la pulpa (Yakob *et al.*, 2000) y la actividad de los genes que codifican para la MAPK cinasa (Zhao *et al.*, 2007) y pectato liasa (Yakob *et al.*, 2000).

growth border. There was no relation between the pathogenicity measured as the invasive capacity of the pulp and this growth rate *in vitro*. The group analyses determined that the relations between the strains are established based mainly on the origin and, in a secondary manner, on the symptom in the fruit.

Key words: *Persea americana*, cluster analysis, isoenzymes, RAPD.

INTRODUCTION

In Mexico, the production of avocado (*Persea americana* cv. Hass) is very important for the national economy, since there are approximately 118 000 hectares planted, with an average yearly production of 1 150 000 t and a yield of 10.5 t ha⁻¹ and exports of up to 260 000 t (Colín, 2009). The state of Michoacán has 90% of the country's avocado farming surface, making it the largest producer worldwide; the most important municipalities for avocado farming are Peribán, Uruapan, Tancítaro, San Juan Nuevo, Tacámbaro, Ario de Rosales, Tingüindín, Zitácuaro, Atapan, Salvador Escalante and Ziracuaretiro. One of the most important factors limiting production, which brings it down even 70%, are fungal diseases, out of which the most important is anthracnose, due to the economic damage it causes; it can be recognized by symptoms such as cracks, stains and y smallpox.

Anthracnose characteristically displays dark and deep lesions, circular or ellipsoidal, with large amounts of compact, orange, pink or salmon-colored masses. The agent that causes this disease is the ascomycete fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Binyamini and Schiffmann-Nadel, 1972). In Michoacán, anthracnose is present in all avocado-producing municipalities, and it attacks the fruit from its formation to its shipping, storage and sale (Morales and Vidales, 1994). The fungus can enter the fruit before the fruit ripens and damage can be seen when during ripeness, which is possible since cellular death is not a necessary condition for pathogenesis by *C. gloeosporioides* (Nesher *et al.*, 2008); also this process is modulated by the pH of the pulp (Yakob *et al.*, 2000); the activity of gens that codify for the MAPK kinase (Zhao *et al.*, 2007); and pectate lyase (Yakob *et al.*, 2000).

The genetic and morphologic characterization of the genus *Colletotrichum* has been attempted for a long time; thus, Smith (1990) characterized the isolated species of

La caracterización genética y morfológica del género *Colletotrichum* se ha intentado realizar desde hace mucho tiempo; así, Smith (1990) caracterizó morfológica, cultural y patogénicamente las especies de *Colletotrichum* aisladas de fresa, estas especies incluyeron *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Maas (1983) pudo diferenciar a *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. coccodes*, *C. trifolii*, *C. dematium*, *G. cingulata* y *Gloeosporium* spp. con base en la virulencia de cada aislamiento. McDonald y McDermott (1993), consideran que los marcadores electroforéticos como las proteínas o isoenzimas estiman de manera muy precisa la estructura genética de las poblaciones; sin embargo, afirman que muchas especies de hongos poseen muy poca variación isoenzimática.

A pesar de lo anterior, Morales (1996) logró separar aislamientos de *C. gloeosporioides* con base en diferentes sistemas isoenzimáticos, aunque no logró obtener buena resolución para ninguna deshidrogenasa. Lenné y Burdon (1990) encontraron seis patotipos de *C. gloeosporioides* asociados a diferentes patrones isoenzimáticos. Bailey y Jeger (1992) reportaron un estudio de variación genética en aislados de *C. gloeosporioides* obtenidos de aguacate, papaya, plátano y mango, confirmando que hay alta variación entre aislamientos del mismo cultivo y en el mismo país, sin embargo algunos aislamientos procedentes de diferentes cultivos fueron similares. Mills *et al.* (1992) reportaron alta diversidad en esta especie aislada de aguacate, mediante el empleo de patrones de restricción con las enzimas Hind III y Bam I e hibridados con el plásmido pMY60 usado como sonda. Sreenivasaprasad *et al.* (1992) utilizó RFLP en DNA ribosómico y mitocondrial de *C. gloeosporioides* aislados de fresa y encontraron que no había variación entre aislamientos.

Ante el presente panorama y considerando la importancia económica y agronómica del aguacate en México, se realizó el presente trabajo con el objetivo de estimar la diversidad genética del hongo *C. gloeosporioides* de Michoacán, para establecer las relaciones genéticas entre cepas de diferentes localidades del área productora de aguacate Hass. Se probó la hipótesis que la adaptación al manejo para el control de enfermedades fungosas en las huertas comerciales de aguacate, que incluye el uso de un alto número de productos químicos (fungicidas) y la plasticidad genética de su ciclo de vida y reproductivo confiere a *C. gloeosporioides* alta variabilidad genética. El conocimiento de este atributo aportará elementos para un control más adecuado de la antracnosis del aguacate.

Colletotrichum in strawberries morphologically, culturally and pathogenically; these species included *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. acutatum*. Maas (1983) was able to differentiate *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, *C. coccodes*, *C. trifolii*, *C. dematium*, *G. cingulata* and *Gloeosporium* spp, based on the virulence each of isolation. McDonald and McDermott (1993) consider that electrophoretic markers such as proteins or isoenzymes estimate very accurately the genetic structure of populations; however, they state that many species of fungus have very little isoenzymatic variation.

Despite this, Morales (1996) was able to separate *C. gloeosporioides* isolations, based on different isoenzymatic systems, but was unable to obtain a good resolution for any hydrogenase. Lenné and Burdon (1990) found six pathotypes of *C. gloeosporioides* related to different isoenzymatic patterns. Bailey and Jeger (1992) reported a genetic variation study in *C. gloeosporioides* isolations taken from avocado, papaya, banana and mango, confirming that there is a high variation between isolations of the same crop and in the same country, although some isolations from different crops were similar. Mills *et al.* (1992) reported a high diversity in this isolated avocado species, using restriction patterns with enzymes Hind III and Bam I, hybridized with the plasmid pMY60, used as a sounding. Sreenivasaprasad *et al.* (1992) used RFLP in ribosomal and mitochondrial DNA of *C. gloeosporioides* strawberries isolation, and found that there were no variations between isolates.

Faced with this outlook and considering the economic importance and agronomical importance of avocado in Mexico, the present work out carried was with the aim of estimating the genetic diversity of the fungus *C. gloeosporioides* in Michoacán, in order to establish the genetic relation between strands from different locations of Hass avocado-producing areas. It confirmed was that the adaptation of handling for the control of fungal diseases in commercial avocado plantations, including the use of a large amount of chemical products (fungicides) and the genetic plasticity of its life and reproductive cycles confers *C. gloeosporioides* high genetic variability. The knowledge of this article will contribute elements to control avocado anthracnose more adequately.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

El presente estudio se realizó en 2005, para lo cual se colectaron tres frutos de aguacate variedad Hass por cada una de tres parcelas con los síntomas representativos producidos por *Colletotrichum gloeosporioides*: antracnosis típica, antracnosis-cuarteaduras, manchas superficiales y viruela. El muestreo se hizo al azar en cada tipo de síntoma en ocho municipios de la franja aguacatera de Michoacán (Los Reyes, Peribán, San Juan Nuevo, Tacámbaro, Tancítaro, Uruapan, Ziracuaretiro y Zirosto).

En total se muestrearon 24 parcelas y 288 frutos, obteniendo un aislado por cada fruto, este tamaño de muestra se definió con base en la capacidad de análisis del laboratorio y en investigaciones reportadas previamente en la literatura científica (Kelemu *et al.*, 1999). Las parcelas muestreadas se distribuyeron formando una diagonal a través de la superficie plantada de cada municipio. Para obtener el material biológico micelial, se hicieron aislamientos a partir de frutos con cada tipo de síntoma en un medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) al 4% en cajas petri de 100 mm de diámetro, siguiendo la técnica de Morales (1996).

A los dos días de crecimiento se reaislaron los diferentes hongos en nuevos subcultivos para obtener aislamientos puros. Cuando estos llenaron la caja y habían esporulado, se hicieron preparaciones temporales con lactofenol azul, para observarse al microscopio compuesto y proceder a su identificación mediante el uso de las claves dicotómicas especializadas de Hanlin (1998); Barnett y Hunter (1998).

De los cultivos puros se obtuvieron aislamientos monoconidiales de la siguiente manera: se sometieron a luz continua durante ocho días para obtener abundante esporulación; posteriormente a cada caja de petri, se le agregaron 10 mL de agua destilada estéril y la superficie del hongo se removió con una espátula para liberar los conidios; el preparado obtenido se consideró como suspensión madre para preparar diluciones sucesivas en proporción 1:10. Los cultivos monoconidiales se obtuvieron con una solución diluida en un factor de 10^{-8} . De 60 aislamientos monoconidiales se seleccionaron 21, por ser representativos de cada tipo, por los síntomas y características morfológicas.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

For this study carried out in 2005, three Hass avocado fruits gathered were from each plot with the representative symptoms produced by *Colletotrichum gloeosporioides*: typical anthracnose, anthracnose-lesions, surface spots and smallpox. Sampling was carried out at random in each type of symptom in 8 municipalities of the avocado-producing area of Michoacán (Reyes, Peribán, San Juan Nuevo, Tacámbaro, Tancítaro, Uruapan, Ziracuaretiro and Zirosto).

In total 24 plots and 288 fruits were sampled, obtaining an isolate for each fruit; sample size was defined based on the lab's capacity of analysis and on investigations previously reported in scientific literature (Kelemu *et al.*, 1999). Sampled plots were distributed forming a diagonal through the planed surface of each municipality. To obtain the mycelia biological material, isolations made were from fruits with each type of symptom in a potato-dextrose-agar (PDA) crop medium at 4% in petri dishes, 100 mm in diameter, following the technique by Morales (1996).

Two days into growth, the different fungi reinsulated were in new subcrops to obtain pure isolations. Once these filled the dish and sporulated had, temporary preparations were made with lactophenol blue, to view under a compound microscope and later identify using the specialized identification keys by Hanlin (1998); Barnett and Hunter (1998).

From the pure crops, monochooidal isolations were taken as follows: they were placed under light for eight days for abundant sporulation; later each petri dish was added 10 mL of distilled water, and the fungal surface was removed with a spatula to release the conidia; the resulting preparation was considered a mother suspension to prepare successive dilutions in a proportion of 1:10. Monochooidal crops were obtained with a diluted solution in a factor of 10^{-8} . Out of 60 monochooidal isolations, 21 were chosen, for being representative of each type, due to the symptoms and morphological characteristics.

Morphological diversity

For the morphological characterization of monochooidal strains (MC), they were grown in a PDA medium in an incubator at 28 °C. The characteristics considered were

Diversidad morfológica

Para la caracterización morfológica de las cepas monoconidiales (MC), se cultivaron en un medio papa-destrosa-agar (PDA) en una incubadora a 28 °C. Los caracteres considerados fueron los siguientes: color, consistencia y tipo de crecimiento del micelio; dirección y longitud de las hifas del borde del cultivo; color y forma del cultivo; color del centro del cultivo; presencia de anillos concéntricos, manchas radiales y estrías. Las mediciones se llevaron a cabo cuando cada MC llenó la caja de cultivo.

Diversidad patogénica

Se determinó mediante la estimación de la capacidad invasiva de pulpa y la velocidad de crecimiento *in vitro*. Para estudiar la capacidad invasiva de pulpa de aguacate se colectaron en el municipio de Uruapan, frutos seleccionados con base a uniformidad de tamaño, madurez fisiológica (tres cuartos de madurez) y contenido de materia seca (23%). En cada una de tres repeticiones, se obtuvieron inóculos de las cajas petri conteniendo el medio PDA con sacabocados de 7 mm de diámetro y se insertaron en tres perforaciones equidistantes practicadas con el mismo sacabocados en un fruto de aguacate Hass.

Los frutos inoculados se mantuvieron ocho días en charolas cubiertas con plástico, para formar una cámara húmeda en condiciones ambientales, después se pesó la pulpa infectada por cada inóculo. Con fines estadísticos los pesos promedio de pulpa invadida, se distribuyeron en una escala de cuatro categorías: el tipo I tuvo un rango de 1 a 3.9 g, tipo II de 4 a 6.9 g, tipo III de 7 a 9.9 g, y el tipo IV de 10 a 12.5 g. Para medir la velocidad de crecimiento *in vitro* se sembraron las 21 MC en cajas petri con PDA y se incubaron a 28 °C en oscuridad total.

Diariamente se midió el diámetro de la colonia con un calibrador tipo vernier, con el objetivo de encontrar la tasa diaria de crecimiento en diámetro y en área, así como el crecimiento acumulado por día. Las mediciones se detuvieron cuando el MC con mayor velocidad de crecimiento llenó la caja petri. Para el análisis de los resultados se consideró una escala de tres categorías de acuerdo al diámetro final alcanzado por cada MC: el tipo I se asignó un rango de 4 a 6 cm, tipo II de 6.7 a 9.3 cm, y el tipo III de 9.4 a 12 cm.

mycelium color, consistency and growth type; direction and length of hyphae on the border of the edge of the crop; crop color and shape; color of the center of the crop; presence of concentric rings, radial stains and streaks. Measurements were taken when each MC filled the petri dish.

Pathogenic diversity

This was established by estimating the invasive capacity of the pulp and the growth speed *in vitro*. To study the invasive capacity of avocado pulp, fruits were selected in the municipality of Uruapan, based on ripeness (three-quarters ripe) and dry matter content (23%). In each of the three repetitions, inoculants were obtained from the petri dishes containing half PDA medium, with a 7 mm puncher, and inserted were in three equidistant perforations made with the same puncher in a Hass avocado fruit.

The inoculated fruits were kept for eight days in plastic-covered trays, to form a humid chamber in ambient conditions, and the infected pulp then weighed was. For statistical purposes, the average weights of the invaded pulp distributed were on a four categories scale: type I had a range of 1 to 3.9 g, type II from 4 to 6.9 g, type III 7 to 9.9 g, and type IV 10 to 12.5 g. To measure the speed of *in vitro* growth, all 21 MCs placed were in petri dishes with PDA and incubated at 28 °C in complete darkness.

The diameter of the crop was measured every day using a vernier height gauge, in order to find the daily growth rate in diameter and area, as well as accumulated growth by day. Measurements stopped when the MC with the greatest growth rate filled the petri dish. For the analysis of the results considered were three categories scales according to the final diameter reached by each MC: type I was given a range of 4 to 6 cm, type II from 6.7 to 9.3 cm, and type III 9.4 to 12 cm.

Genetic diversity

This was carried out with the analysis of isoenzymatic zymograms and by the random amplification of polymorphic DNA (RAPD). The isoenzymatic zymograms were obtained by electrophoresis in 12% horizontal starch gel; the enzymes considered were malate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, catalase, isocitrate dehydrogenase, esterase, acid phosphatase and glutamic oxaloacetic transaminase.

Diversidad genética

Se llevó a cabo mediante el análisis de zimogramas isoenzimáticos y por medio de amplificación de fragmentos de polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD). Los zimogramas isoenzimáticos se obtuvieron por electroforesis en gel horizontal de almidón al 12%; las enzimas consideradas fueron malato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, catalasa, isocitrato deshidrogenasa, esterasa, fosfatasa ácida y transaminasa glutámico oxaloacética.

Para obtener la muestra que se usó en la electroforesis las 21 MC, se cultivaron en 100 mL de medio líquido papa-dextrosa. La preparación de este medio se hizo hirviendo 200 g de papas frescas picadas en 500 mL de agua destilada durante 10 min, posteriormente la solución obtenida se filtró a través de manta de cielo estéril, se agregaron 20 g de dextrosa y se aforó a 500 mL. El medio se distribuyó en porciones de 100 mL dentro de matraces de 250 mL y en cada uno se colocaron tres rodajas de 7 mm de diámetro de cada MC. Los matraces se mantuvieron a 28 °C y con agitación orbital de 200 rpm.

Cuando el micelio llenó el matraz, se filtró a través de manta de cielo estéril y se exprimió para eliminar la máxima cantidad de medio posible. La masa de micelio obtenida se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó a -50 °C con presión de vacío de 10 mBar. Las muestras liofilizadas se molieron finamente en un molino para café hasta obtener un polvo muy fino y se guardaron a -20 °C hasta su uso. La preparación de los geles y las condiciones generales de la electroforesis fueron establecidas por Stuber *et al.* (1988).

La extracción de ADN genómico, se realizó a partir de polvo liofilizado siguiendo el método de Raeder y Broda (1985) modificado por Sreenivasaprasad *et al.* (1992). La PCR se realizó usando 20 iniciadores decámeros de Operon Technologies Inc. Las reacciones de amplificación en volúmenes de 20 µL, se prepararon a las concentraciones finales siguientes: ADN genómico (40 ng), iniciador (10 µM), Taq polimerasa (1 unidad), dNTP's (200 µM cada uno), MgCl₂ (2 mM) y buffer 10X (2µL).

Para la amplificación se usó el termociclador Ericomp Delta Cycler II, el programa de amplificación estuvo compuesto por un ciclo inicial de desnaturalización de 7 min a 94 °C, tres ciclos de 94 °C durante 1 min, 36 °C por 1 min y 72 °C por 2 min; 36 ciclos de 94 °C durante 10 s, 40 °C por 20 s y 72 °C durante 2 min; y un ciclo de extensión final de 72 °C

In order to obtain the sample used in the electrophoresis, the 21 MC were cultivated in 100 mL of liquid potato-dextrose medium. This medium was prepared by boiling 200 g of fresh chopped potatoes in 500 mL distilled water for 10 min. The resulting solution was filtered through sterile cheesecloth; 20 g of dextrose were added and gaged at 500 mL. The medium was distributed in portions of 100 mL, and three 7 mm thick slices were placed in each MC. The flasks were kept at 28 °C and with an orbital stir of 200 rpm.

When the mycelium filled the flask, it was filtered through cheesecloth and wrung to eliminate the most medium possible. The resulting mycelium mass was frozen with liquid nitrogen and freeze-dried at -50 °C with a vacuum pressure of 10 mBar. The freeze-dried samples were finely grounded in a coffee grinder until they became a very fine powder, and were then stored at -20 °C until they were to be used. Gels and general conditions for the electrophoresis were prepared by Stuber *et al.* (1988).

The genomic DNA was extracted using freeze-dried powder, following the method by Raeder and Broda (1985), modified by Sreenivasaprasad *et al.* (1992). PCR was performed using 20 Operon Technologies Inc. initiator decamers. The amplification reactions in volumes of 20 µL were prepared in the following final concentrations: genomic DNA (40 ng), initiator (10 µM), Taq polymerase (1 unit), dNTP's (200 µM each), MgCl₂ (2 mM) and buffer 10X (2µL).

The Ericomp Delta Cycler II thermal cycler was used for amplification, and the amplification program was made up of an initial 7 min denaturalization cycle at 94 °C, three cycles at 94 °C for 1 min, 36 °C for 1 min and 72 °C for 2 min; 36 cycles at 94 °C for 10 s, 40 °C for 20 s and 72 °C for 2 min; and a final extension cycle at 72 °C for 5 min. The amplified products were separated by electrophoresis in agar gels at 1.5%, using a voltage of 5V/cm.

Statistical analysis

The data of morphological experiments of RAPD, pathogenic and growth speed isoenzymes were codified in a binary presence/absence format, including the quantitative characters that are categorized in ranges for their normal distribution, and the presence/absence of each was taken into account.

por 5 min. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% aplicando un voltaje de 5V/cm.

Análisis estadístico

Los datos de los experimentos morfológicos de isoenzimas RAPD, patogénico y velocidad de crecimiento; se codificaron en formato binario de presencia/ausencia, incluyendo los caracteres cuantitativos que por su distribución normal se categorizaron en rangos y se consideró la presencia/ausencia en cada uno de estos.

La codificación se hizo de acuerdo a los lineamientos establecidos por Crisci y López (1983); con este procedimiento se formó una matriz de ceros y unos, que se consideró como la matriz de datos originales, a partir de la cual se calcularon distancias genéticas mediante el programa de cómputo Numerical Taxonomy System (NTSYS) (Rohlf, 1993) y usando el algoritmo de Rogers y Tanimoto (1960).

Con la nueva matriz se realizaron análisis de agrupamiento, que generaron dendrogramas con el método Neighbor Join Tree, para conocer las relaciones de semejanza entre todos los monoconidiales; también se calculó el índice de variabilidad genética (IVG), propuesto por Montero *et al.* (1998), para calcular la diversidad genética con base en caracteres.

Este índice se utilizó para uniformizar las estimaciones de variabilidad; además se hizo un análisis de componentes principales que se complementó con la correlación de Pearson y coeficientes de determinación, con el objeto de encontrar las variables que poseen la mayor varianza acumulada, para explicar de manera general la distribución de la variabilidad de *C. gloeosporioides*, además de identificar las variables características que lo describen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad morfológica

El análisis de componentes principales (ACP), demostró amplia variabilidad en los caracteres morfológicos ya que los primeros ocho presentaron una proporción acumulada que explica la variabilidad observada en 81.5%, lo que indica que la varianza estadística observada, se distribuye en varios componentes incrementando el número de variables requeridas para cubrir la diversidad morfológica observada.

Codification was performed according to the guidelines established by Crisci and López (1983); with this procedure a matrix of ones and zeroes was formed, considered the matrix of original data, from which genetic distances were calculated using the computer program Numerical Taxonomy System (NTSYS) (Rohlf, 1993) and the algorithm by Rogers and Tanimoto (1960).

The new matrix helped carry out cluster analyses, which led to creating dendrograms with the Neighbor Join Tree method, to know the similarities between all monoconidials; the genetic variability index (IVG), suggested by Montero *et al.* (1998), was also calculated, to work out the genetic diversity based on characteristics.

This index was used to homogenize the variability estimations; a main components analysis was also carried out, complemented with the Pearson correlation and determination coefficients, in order to find the variables with the most accumulated variance, to explain in general terms the distribution of variability of *C. gloeosporioides*, apart from identifying the characteristic variables that describe it.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological diversity

The main components analysis (ACP), showed wide variability in the morphological characteristics, since the first eight presented an accumulated proportion that explains the variability of 81.5%, which indicates that the observed statistical variance is distributed in various components, increasing the number of variables needed to cover the observed morphological diversity.

The analysis of determination coefficients showed that the minimal variables that describe the diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* are: presence of concentric rings (accumulated variance= 0.2152), presence of radial stains (0.2055), cotton-like consistency of the mycelium (0.287), very dark gray center (0.2057), shape of the edge of growth (0.2415), growth speed type II (0.3171) and III (0.2438), invasive capacity of pulp type I (0.2097) and III (0.2793).

The cluster analysis led to the dendrogram shown in Figure 1A, in which we can see that the MC 57 completely separated is from the rest at a greater distance than 0.36. At a distance slightly over 0.24, the large groups I and II formed

El análisis de coeficientes de determinación, demostró que las variables mínimas que describen la diversidad de *Colletotrichum gloeosporioides* son: presencia de anillos concéntricos (varianza acumulada igual a 0.2152), presencia de manchas radiales (0.2055), consistencia algodonosa del micelio (0.2870), centro gris muy oscuro (0.2057), forma del borde de crecimiento (0.2415), velocidad de crecimiento tipo II (0.3171) y III (0.2438), capacidad invasiva de pulpa tipo I (0.2097) y III (0.2793).

El análisis de agrupamiento originó el dendrograma que se muestra en la Figura 1A, en la que se observa que el MC 57, se separa completamente del resto a una distancia mayor de 0.36. A distancia un poco mayor de 0.24 se forman los

are, with group I formed by Uruapan monoconidials; at an approximate distance of 0.24 group II splits into subgroups 2A and 2B. In 2A, two of the MCs are from Uruapan, and in 2B there are three MCs that cause smallpox, four that cause surface stains and two-cause anthracnose. Therefore, the general distribution of the dendrogram presents itself based on the location the fungus was collected, and the symptoms it causes.

By calculations of the distance to the centroid, the correspondence analysis established, that the characteristic variables (distance less than or equal to 1) of this fungus were: white mycelium with a cotton-like consistency, white culture color, random mycelium growth and

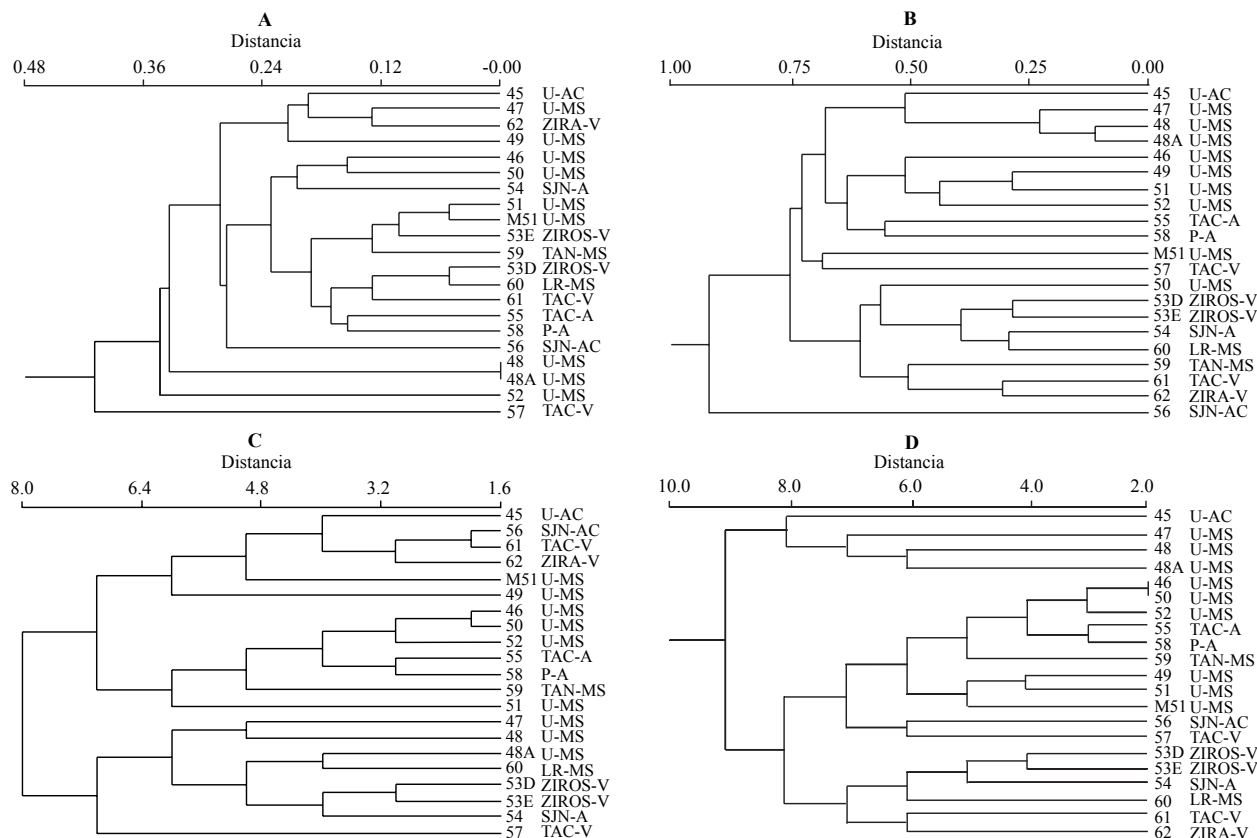


Figura 1. Análisis de agrupamiento que considera los diversos grupos de datos: A) morfológicos; B) isoenzimáticos; C) bandas RAPD y D) total de caracteres. A la derecha se observan el número de identificación de cada MC y abreviados, la localidad y el síntoma que producen. LR= Los Reyes; P= Peribán; SJN= San Juan Nuevo; TAC= Tacámbaro; TAN= Tancítaro; U= Uruapan; ZIRA= Ziracuaretiro; ZIROS= Zirosso; A= antracnosis; AC= antracnosis-cuartheaduras; MS= manchas superficiales y V= viruela.

Figure 1. Cluster analysis considering the diverse data groups: A) morphological; B) isoenzymatic; C) RAPD strips and D) total characteristics. To the right are the identification numbers for each MC, and abbreviated, the location and the symptom caused. LR= Los Reyes; P= Peribán; SJN= San Juan Nuevo; TAC= Tacámbaro; TAN= Tancítaro; U=Uruapan; ZIRA= Ziracuaretiro; ZIROS= Zirosso; A= anthracnose; AC= anthracnose-lesions; MS= surface stains and V= smallpox.

grandes grupos I y II, con el grupo I formado por monoconidiales de Uruapan; a distancia aproximada de 0.24 el grupo II, se subdivide en los subgrupos 2A y 2B, en el 2A dos de los MC son de Uruapan y en el 2B se observan tres MC que producen viruela, cuatro que producen manchas superficiales y dos producen antracnosis. Por lo tanto, la distribución general del dendrograma se manifiesta con base en la localidad de colecta del hongo y los síntomas que produce.

El análisis de correspondencia determinó por medio del cálculo de la distancia al centroide, que las variables características (distancia menor o igual a 1) de este hongo fueron: micelio blanco de consistencia algodonosa, color de colonia blanca, crecimiento de micelio al azar e hifas del borde de crecimiento cortas que crecen al azar. Por otra parte, las variables más raras (mayor distancia al centroide) fueron: micelio blanco cremoso, colonia blanco grisácea, colonia blanco cremosa, micelio adsorbido al medio de cultivo y centro de la colonia de color amarillo-naranja.

Los caracteres morfológicos *in vitro* resultaron buenos descriptores de la diversidad de *C. gloeosporioides*, sobre todo en conjunción con la caracterización molecular; sin embargo, pocos trabajos en esta especie han puesto tal nivel de atención en ello (Morales, 1996 y 2000); limitándose a la medición de características básicas como la tasa de crecimiento *in vitro*. Álvarez *et al.* (2004) caracterizaron 54 aislados de *C. gloeosporioides* de *Annona muricata*, obteniendo como resultado únicamente tres tipos de colonia.

Diversidad patogénica

En la Figura 2, se observa una amplia variabilidad patogénica entre cepas; el análisis de correlación entre las variables demostró que la patogenicidad en aguacates, es un evento independiente a la velocidad de crecimiento en medios de cultivo. La MC 62 presenta la mayor cobertura final en medios de cultivo, pero es de patogenicidad media. La MC 54 es de baja cobertura en caja petri, pero es altamente patogénico. Finalmente se observó que el cuarto día de cultivo *in vitro*, la velocidad de crecimiento presenta una caída con respecto a los días anteriores y posteriores, este fenómeno coincide con el inicio de la producción masiva de conidios, lo cual sugiere una mayor inversión energética a favor de la reproducción.

short hyphae on the growth edge that grow randomly. On the other hand, the rarest variables (greater distance to the centroid) were: creamy white mycelium, grayish white culture, creamy white culture, mycelium adsorbed to the crop medium and center of the culture colored yellow-orange.

The morphological characteristics *in vitro* properly describe the diversity of *C. gloeosporioides*, especially when combined with molecular characterization. However, few works on this species have paid such attention to it (Morales, 1996 and 2000); but have been limited to measuring basic characteristics such as *in vitro* growth rate. Álvarez *et al.* (2004) characterized 54 *C. gloeosporioides* isolates from *Annona muricata*, with only three types of cultures as a result.

Pathogenic diversity

Figure 2 shows a wide pathogenic variability between strains; the analysis of correlation between the variables showed that the pathogenicity in avocados is independent to growth rate in culture media. MC 62 shows the largest spread in culture media, but its pathogenicity is medium. MC 54 has a low spread in a petri dish, but is highly pathogenic. Finally, it was observed that on the fourth day *in vitro*, growth rate falls in comparison to earlier and later days; this coincides with the start of mass production of conids, which suggests a greater energy investment favoring reproduction.

Pathogenicity is a characteristic commonly used to differentiate isolations of *Colletotrichum* species the results agree with those by Freeman *et al.* (1996), who analyzed the pathogenicity of *C. gloeosporioides* isolates in avocado and almond trees using fruit pathogenicity. They found that the avocado isolates had greater variability, since they were able to infect both species with diverse severity patterns.

Likewise, Casarrubias *et al.* (2003) found pathogenic diversity between *C. gloeosporioides* isolates in papaya fruit from Veracruz, Chiapas and Campeche and they proposed that this characteristic can be correlated with groups obtained in a dendrogram, made with data from RAPD molecular markers. Similar results were obtained by Rojas *et al.* (2008) in mango isolations.

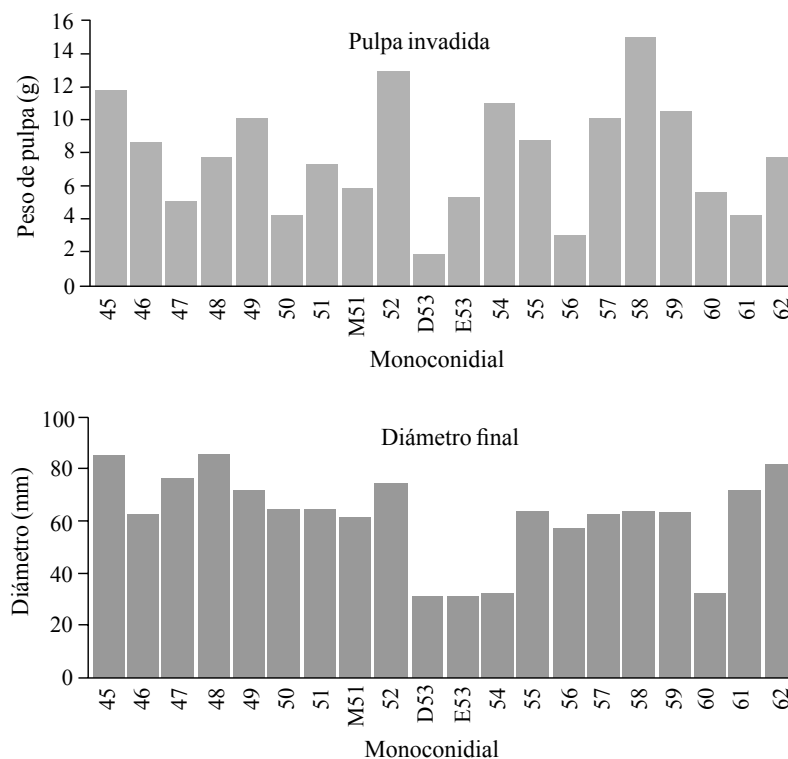


Figura 2. Gráficas que muestran la capacidad patogénica de *C. gloeosporioides*.
Figure 2. Graphs to show the pathogenic capacity of *C. gloeosporioides*.

La patogenicidad es una característica que se usa comúnmente, para diferenciar aislamientos de especies de *Colletotrichum* y los resultados presentados concuerdan con las investigaciones de Freeman *et al.* (1996), en la cual analizaron la patogenicidad de aislados de *C. gloeosporioides* de aguacate y almendro por medio de la patogenicidad en fruto y encontraron que los aislados de aguacate presentaban mayor variabilidad, ya que eran capaces de infectar a ambas especies con diversos patrones de severidad.

Del mismo modo, Casarrubias *et al.* (2003) encontraron diversidad patogénica entre aislados de *C. gloeosporioides* de fruto de papaya procedentes de Veracruz, Chiapas y Campeche y propusieron que esta característica se puede correlacionar con grupos obtenidos en un dendrograma, realizado con datos de marcadores moleculares RAPD. Resultados similares reportan Rojas *et al.* (2008) en aislamientos de mango.

Diversidad bioquímica

Los ocho sistemas enzimáticos definieron 17 loci y 44 alelos. Se consideró un locus como cada una de las zonas de

Biochemical diversity

The eight enzyme systems defined 17 loci and 44 alleles. A locus was defined as each activity zone in the zymogram of each enzyme. An allele was defined as each band of enzyme activity found in each locus.

Figure 3 shows a typical zymogram, and that out of the eight enzymes studied, four were dehydrogenases (malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase); all of which Morales (1998) considered hard to resolve for *C. gloeosporioides*.

The enzyme isocitrate dehydrogenase presented a pattern in two bands related to each allele, whereas the rest presented a band per allele.

The characteristic value of the ACO had two behaviors: the first two CPs were high, with proportions of 22.95% and 15.44%, and the following six had low values (9.74%, 8.49%, 7.6%, 6.76%, 4.98% and 3.98%).

actividad en el zimograma de cada enzima, un alelo fue cada una de las bandas de actividad enzimática detectadas en cada locus.

Un zimograma típico se muestra en la Figura 3, se observa que las ocho enzimas estudiadas cuatro fueron deshidrogenasas (malato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa); las cuales, Morales (1998) consideraban de difícil resolución para *C. gloeosporioides*.

La enzima isocitrato deshidrogenasa presentó un patrón de dos bandas asociadas a cada alelo, las demás presentaron una banda por cada alelo.

These main components showed an accumulated proportion of 79.8%, and given that this percentage is high, we can conclude, as in the main components analysis of the morphological data, that the inside of each component is small and that there are many important alleles in the description of the variability of this fungus.

We can therefore conclude that the fungus *C. gloeosporioides* presents a great diversity of types. These results agree with Bonde *et al.* (1991), who proved that isoenzymatic patterns were more diverse in *C. gloeosporioides* than in isolated strawberry *C. acutatum* and *C. fragariae*.

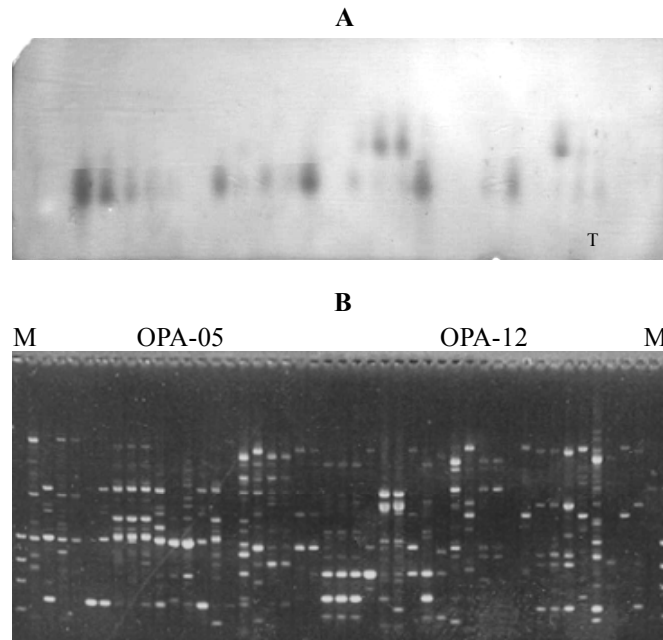


Figura 3. Perfiles de bandas típicas de Isoenzimas y RAPD de *C. gloeosporioides*. A) Zimograma de la enzima Transaminasa Glutámico Oxaloacética y B) RAPD amplificados con los iniciadores OPA-05 y OPA-12. M= marcador Φ X174/*Hae* III.

Figure 3. Profiles of typical isoenzyme bands and RAPD of *C. gloeosporioides*. A) Zymogram of the enzyme glutamic oxaloacetic transaminase and B) RAPD amplified with initiators OPA-05 and OPA-12. M= marker Φ X174/*Hae* III.

Los valores característicos del ACP tuvieron dos comportamientos: los dos primeros CP fueron altos con proporción de 22.95% y 15.44% y los siguientes seis tuvieron valores bajos (9.74%, 8.49%, 7.6%, 6.76%, 4.98% y 3.98%).

Estos componentes principales presentaron una proporción acumulada de 79.8%; dado que este porcentaje es alto se puede concluir, al igual que para el análisis de componentes principales de los datos morfológicos, la varianza al

With the characteristic vector matrix as a starting point, a determination coefficient analysis was carried out, and the minimum cluster of isoenzyme bands that describe the total isoenzymatic variability turned out to be Mdh2-1, Mdh3-2, Mdh3-3, Adh1-1, Adh2-1, Cat2-1, Idh1-1, Est1-4, Est4-1, Acp1-3 and Got1-1.

With the analysis of correspondence, it was found that the most common alleles and with the shortest distance to the

interior de cada componente es pequeña y que hay muchos alelos importantes en la descripción de la variabilidad de este hongo.

Por lo tanto, se concluye que el hongo *C. gloeosporioides*, presenta una gran diversidad de tipos. Estos resultados concuerdan con Bonde *et al.* (1991) quienes demostraron que los patrones isoenzimáticos fueron más diversos en *C. gloeosporioides* que en *C. acutatum* y *C. fragariae* aislados de fresa.

A partir de la matriz de los vectores característicos, se hizo un análisis de coeficientes de determinación y varianza acumulada y se encontró que el conjunto mínimo de bandas de isoenzimas, que describen la variabilidad isoenzimática total observada son: Mdh2-1, Mdh3-2, Mdh3-3, Adh1-1, Adh2-1, Cat2-1, Idh1-1, Est1-4, Est4-1, Acp1-3 y Got1-1.

Con el análisis de correspondencia se encontró que los alelos más comunes y que presentan la distancia más corta al centroide son Mdh3-2, Idh1-1, Idh2-3, Est1-4, Est2-1, Est4-1 y Acp1-3. Por otra parte, las variables más raras (las que tienen mayor distancia con respecto al centroide) son: Idh1-2, Idh2-1, Est1-1, Acp1-1 y Acp2-1.

En el dendrograma de la Figura 1B se observa que el MC 56, se separa completamente de los demás, los cuales forman dos grandes grupos, en el primero de ellos se observa una gran preponderancia de los MC de Uruapan y en el segundo se encuentran cuatro de los cinco MC, que producen viruela formando parejas. En general, se puede describir que al igual que los análisis morfológicos el agrupamiento se manifiesta primariamente con base en la localidad de colecta y después en los síntomas producidos.

Diversidad por RAPD

Para este análisis de diversidad genética se seleccionaron los cuatro iniciadores que detectaron mayor variabilidad, los cuales definieron 93 bandas: el iniciador OPB06 presentó 18 bandas; OPQ09 38, OPA09 25 y OPV06 12 bandas. Productos de amplificación típicos se observan en la figura 3B.

La matriz de valores característicos del ACP mostró una distribución continua de los componentes principales (CP), ya que el CP1 representa 19% de la variabilidad total, CP2 16.3%, CP3 11.3%; CP4 8.2% y el CP5 6.7%. Con los primeros siete CP se explica 73.6% de la variabilidad total y con los primeros once CP explican 89%;

centroid are Mdh3-2, Idh1-1, Idh2-3, Est1-4, Est2-1, Est4-1 and Acp1-3. On the other hand, the rarest variables (those with the greatest distance to the centroid) are: Idh1-2, Idh2-1, Est1-1, Acp1-1 and Acp2-1.

The dendrogram in Figure 1B shows that the MC 56, is completely separated from the rest, which form two groups, in the first of which there is a great predominance of the MC from Uruapan, and the second contains four of the five MCs, which cause smallpox forming couples. In general terms, it can be said that like in the morphological analyses, the cluster is mainly manifested based on the location the fruit was gathered, and then on the symptoms produced.

Diversity by RAPD

For this analysis of genetic diversity, the four initiators were chosen that found greater variability and defined 93 bands: the initiator OPB06 presented 18 bands; OPQ09 38, OPA09 25 and OPV06 12. Figure 3B shows typical amplification products.

The matrix of characteristic values of the ACP showed a continuous distribution of the main components (CP), since CP1 accounts for 19% of the total variability, CP2 16.3%, CP3 11.3%, CP4 8.2% and CP5 6.7%. The first seven CPs account for 73.6% of the total variability, and the first eleven CPs account for 89%, in the same way that the analyses with morphological and isoenzymatic characteristics show the wide variability displayed by *C. gloeosporioides*.

By applying determination coefficients and accumulated variance, the loci that best describe the total variability observed are: OPB06.3, OPB06.8, OPB06.10, OPB06.11, OPQ09.14, OPQ09.18, OPQ09.28, OPQ09.30, OPQ09.31, OPQ09.33, OPQ09.35, OPQ09.36, OPQ09.37, OPA09.06, OPA09.14, OPA09.15, OPA09.18, OPA09.20, OPA09.23 and OPV06.05. On the other hand, the loci that are characteristic of this fungus, according to the analysis of correspondence, are: OPB06.11, OPB06.13, OPB06.14, OPB06.15, OPQ09.07, OPQ09.12, OPQ09.18, OPQ09.19, OPQ09.24 and OPA09.11. The rarest loci (low frequency and distance to the centroid equal to or greater than 12) are OPB06.07, OPB06.16, OPQ09.14, OPQ09.28, OPQ09.33, OPQ09.35, OPQ09.36 and OPQ09.37.

Figure 1C shows the formation of groups by location, since group I contain seven of the monoconidials from Uruapan. In group II there are three monoconidials from zirosto that cause

al igual que en los análisis con caracteres morfológicos e isoenzimáticos demuestra la amplia variabilidad exhibida por *C. gloeosporioides*.

Mediante la aplicación de coeficientes de determinación y varianza acumulada se encontró, que los loci que mejor describen la variabilidad total observada son: OPB06.3, OPB06.8, OPB06.10, OPB06.11, OPQ09.14, OPQ09.18, OPQ09.28, OPQ09.30, OPQ09.31, OPQ09.33, OPQ09.35, OPQ09.36, OPQ09.37, OPA09.06, OPA09.14, OPA09.15, OPA09.18, OPA09.20, OPA09.23 y OPV06.05. En cambio los loci característicos de este hongo, de acuerdo al análisis de correspondencia, son: OPB06.11, OPB06.13, OPB06.14, OPB06.15, OPQ09.07, OPQ09.12, OPQ09.18, OPQ09.19, OPQ09.24 y OPA09.11. Por otra parte, los loci más raros (de frecuencia baja y distancia al centroide igual o mayor a 12) son: OPB06.07, OPB06.16, OPQ09.14, OPQ09.28, OPQ09.33, OPQ09.35, OPQ09.36 y OPQ09.37.

En la Figura 1C puede observarse la formación de grupos por localidad, ya que el grupo I contiene siete de los monoconidiales procedentes de Uruapan. En el grupo II hay tres monoconidiales procedentes de Uruapan que causan manchas superficiales, pero los monoconidiales de zirosto causantes de viruela se agrupan estrechamente, asimismo los monoconidiales procedentes de Tacámbaro y Peribán que causan antracnosis se unen estrechamente en el subgrupo IA. La distribución de este dendrograma es similar, como en el caso de los análisis morfológicos y de isoenzimas, con base en la localidad y síntomas producidos.

Los estimadores estadísticos usados en este estudio confirman la amplia variabilidad genética de *C. gloeosporioides*; esta característica ha sido reportada en diferentes ocasiones, aunque en México sólo se ha realizado el trabajo de Morales (1996 y 2000). En el estado de Michoacán esta amplia variabilidad genética, puede ser ocasionada por el intenso intercambio de germoplasma de aguacate en forma de plantas recién injertadas o frutos; esto puede suceder porque la gran mayoría de los viveros se encuentra en Uruapan y de aquí se distribuyen plantas a las otras localidades.

Por otra parte, el municipio de Uruapan es el lugar donde se concentra la producción de aguacate para ser comercializada y principalmente se envía a la ciudad de México y Guadalajara; este intenso tráfico propicia un intercambio de germoplasma del hongo que se encuentra como infección latente (sin síntomas visibles) en plantas y frutos. Además se debe considerar la capacidad de *C. gloeosporioides*

smallpox are narrowly clustered, like the monoconidials from Tacámbaro and Peribán that cause anthracnose relate narrowly in subgroup IA. The distribution of this dendrogram is similar to the morphological and isoenzyme analyses, based on the location and symptoms produced.

The statistical estimators used in this work confirm the wide genetic variability of *C. gloeosporioides*; this trait has been reported on many occasions, yet in Mexico, only Morales (1996 and 2000) has worked on it. In the state of Michoacán, this wide genetic variability can be caused by the intense exchange of avocado germplasm in the form of newly grafted plants or fruits; this can occur because most of the greenhouses are in Uruapan, and from there, plants are distributed to many other locations.

Likewise, the municipality of Uruapan is the place where avocado production is centered for be commercialization and mainly sent to Mexico City and Guadalajara. This intense traffic brings about an exchange in the germplasm of the fungus, found as a latent infection (without visible symptoms) in plants and fruits. The capacity of *C. gloeosporioides* to reproduce sexually must also be considered, apart from being a heterothallic species that includes meiosis as a type of reproduction, and thus the crossing of chromosomal segments, and along with mutations, is the largest source of variability of this fungus, the sexual phase of which (*Glomerella cingulata*), is widely recognized.

Another possible source of genetic variability is the intergeneric transfer of ribosomal genes, reported by Xie *et al.* (2008) and of supernumerary chromosomes (He *et al.*, 1998); it is also distributed through spores, which helps genetic material exchange at considerable distances, and reaching different locations.

Genetic variability index

Table 1 shows the values of the genetic variability indices (IVG) obtained with each data category, in which it is possible to see that in the morphological characteristics a lower diversity magnitude is estimated than with isoenzymes and RAPD. The value of the IVG for the RAPD bands was of 0.344 (Table 1), the value of which is approximately equal to the one found by isoenzymatic analyses (0.35); this indicates that both systems are equally predictable in the detection and description of the genetic diversity of *C. gloeosporioides*.

para reproducirse sexualmente, siendo además una especie heterotálica que incluye la meiosis como un tipo de reproducción y por consiguiente el entrecruzamiento de segmentos cromosómicos, y junto con las mutaciones, es la mayor fuente de variabilidad de este hongo, cuya fase sexual *Glomerella cingulata*, es ampliamente reconocida.

Otra posible fuente de variabilidad genética, es la transferencia intergenérica de genes ribosómicos reportada por Xie *et al.* (2008) y de cromosomas supernumerarios (He *et al.*, 1998); también se distribuye por la dispersión por esporas, que facilita el intercambio de material genético a distancias considerables pudiendo abarcar diferentes localidades.

Índice de variabilidad genética

En el Cuadro 1 se observan los valores de los índices de variabilidad genética (IVG), obtenidos con cada categoría de datos; en la cual, se observa que con los caracteres morfológicos se estima una magnitud menor de diversidad que con isoenzimas y RAPD. El valor del IVG para las bandas RAPD fue de 0.344 (Cuadro 1); cuyo valor es aproximadamente igual al encontrado mediante análisis isoenzimáticos (0.35); esto indica que ambos sistemas son igualmente predecibles en la detección y descripción de la diversidad genética de *C. gloeosporioides*.

Adicionalmente se calcularon el porcentaje de caracteres polimórficos (PCP) y número promedio de caracteres por locus. El PCP fue 71% en RAPD; 68.2% en isoenzimas y 61.5% en caracteres morfológicos, lo cual proporciona una estimación de la amplia variabilidad genética exhibida por este hongo. Se han reportado múltiples trabajos que demuestran la alta variabilidad genética de esta especie estimada mediante diversas herramientas moleculares.

Álvarez *et al.* (2004) usaron amplificación aleatoria de microsatélites y PCR-RFLP, técnicas con las que detectaron variabilidad genética usando sólo un iniciador microsatélite y digestión con ocho enzimas de restricción. Los dendrogramas que obtuvieron definieron agrupamientos principalmente por localidad de colecta y patogenicidad de cepas. Casarrubias *et al.* (2003) estudiaron la variabilidad genética de *C. gloeosporioides* aislados de *Carica papaya* procedente de Veracruz, Campeche y Chiapas y obtuvieron dendrogramas que definen grupos por localidad de colecta. Resultados similares se obtuvieron en aislados de *Arachis pintoi* (Kelemu *et al.*, 2000) y mango (Rojas *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Estimadores de variabilidad genética.
Table 1. Genetic variability estimators.

Características	IVG	NTC ¹	PCP	PCL ²
Morfológicos	0.215	39	61.5	2.9
Isoenzimas	0.350	44	68.2	2.6
RAPD	0.344	93	71.0	23.2
Total	0.303	176	66.9	9.6

IVG= índice de variabilidad genética; NTC= número total de caracteres; PCP= porcentaje de caracteres polimórficos; PCL= promedio de caracteres por locus. ¹= para isoenzimas se refiere a alelos, para RAPD se refiere a bandas; ²= para RAPD se considera cada iniciador como locus.

In addition, the percentage of polymorphic characteristics (PCP) and average number of characteristics were calculated per locus. The PCP was 71% in RAPD; 68.2% in isoenzymes and 61.5% in morphological characteristics, which provides an estimate of the genetic variability presented by this fungus. Multiple investigations have proven the high genetic variability of this species, estimated by means of diverse molecular tools.

Álvarez *et al.* (2004) used random amplification of microsatellites and PCR-RFLP, techniques which they detected genetic variability with only one microsatellite initiator and digestion with eight restriction enzymes. The dendrograms obtained defined clusters, mainly by location of gathering and strain pathogenicity. Casarrubias *et al.* (2003) studied the genetic variability of isolated *C. gloeosporioides* of *Carica papaya* from Veracruz, Campeche and Chiapas, and obtained dendrograms that define groups by location gathered. Similar results were obtained in *Arachis pintoi* isolates (Kelemu *et al.*, 2000) and mango (Rojas *et al.*, 2008).

CONCLUSIONS

We can conclude that *C. gloeosporioides* is a genetically variable fungus, since all estimators related to the genetic diversity considered in this study display high values.

The isoenzymatic and RAPD fragment patterns, are better estimators of genetic variability than morphological characteristics; however, there is complementarity between them all.

The genetic relations that are determined between the different monoconidial strains are influenced by original location and the symptoms produced.

End of the English version



CONCLUSIONES

Se concluye que *C. gloeosporioides* es un hongo genéticamente variable, ya que todos los estimadores relacionados con la diversidad genética considerados en este estudio presentan valores altos.

Los patrones isoenzimáticos y de fragmentos RAPD, son mejores estimadores de la variabilidad genética que los caracteres morfológicos; sin embargo, existe complementariedad entre todos ellos.

Las relaciones genéticas que se establecen entre las diferentes cepas monoconidiales están influenciadas por la localidad de origen y por los síntomas que producen.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por la beca No. 11384 otorgada a Víctor Montero Tavera.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, E.; Ospina, C. A.; Mejía, J. F. y Llano, G. A. 2004. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el Valle de Cauca. *Fitopatol. Colom.* 28:1-8.
- Bailey, A. J. and Jeger, J. M. 1992. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. British Society for Plant Pathology. CAB. International. 388 p.
- Barnett, L. H. y Hunter, B. B. 1998. *Illustrated general of imperfect fungi*. The American Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota, USA. 219 p.
- Binyamini, N. and Schiffmann-Nadel, M. 1972. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology.* 62:592-294.
- Bonde, M. R.; Peterson, G. L. and Maas, J. L. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology.* 81:1523-1528.
- Casarrubias, C. U.; González, C. M. M.; Cruz, H. A.; Cárdenas, S. E.; Nieto, A. D. y Guevara, G. R. G. 2003. Variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:338-345.
- Colín, M. 2009. Comercialización de aguacate, inmune a la crisis. México líder en producción y ventas. México libre. URL: <http://www.mexicolibre.com.mx/content/view/432712/28/>.
- Crisci, J. V. y López, M. F. 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. O. E. A. Serie de biología. Monografía. Núm. 26. Washington DC, USA.
- Freeman, S.; Kattan, T. and Shabi, E. 1996. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1014-1020.
- Hanlin, T. R. 1998. *Illustrated genera of Ascomycetes*. Vol. I. *Am. Phytopathol. Soc. USA.* 118-119 pp.
- He, C.; Rusu, G. A.; Poplawski, M. A.; Irwin, J. A. G. and Manners, M. J. 1998. Transfer of a supernumerary chromosome between vegetatively incompatible biotypes of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Genetics.* 150:1459-1466.
- Kelemu, S.; Skinner, Z. D.; Badel, L. J.; Moreno, X. C.; Rodríguez, X. M.; Fernández, D. C.; Charchar, J. M. and Chakraborty, S. 1999. Genetic diversity in south american *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from *Stylosanthes guianensis*, a tropical forage legume. *Eur. J. Plant. Pathol.* 105:261-272.
- Kelemu, S.; Muñoz, F. y Rodríguez, X. M. 2000. Diversidad genética y patogénica de los aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* que infectan la leguminosa forrajera *Arachis pintoi*. *Pasturas tropicales.* 22:16-21.
- Lenné, J. M. and Burdon, J. J. 1990. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Stylosanthes guianensis*. *Phytopathology.* 80:728-731.
- Maas, J. C. 1983. Pathogenicity and gel electrophoretic protein pattern comparisons among strawberry anthracnose fungi. *Phytopathology.* 73:838-843.
- McDonald, B. A. and McDermott, J. M. 1993. Population's genetics of plant pathogenic fungi. Electrophoretic markers give unprecedented precision to analyses of genetic structure of populations. *BioScience.* 43(5):311-319.
- Mills, P. R.; Hodson, A. and Brown, A. E. 1992. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. *In: Colletotrichum: biology, pathology and control*. Bailey, A. J. and Jeger, J. M. 1992. CAB. International. 388 p.

- Montero, T. V.; Montalvo, H. L.; García, M. J. L.; Azpiroz, R. H. S.; Peña, L. A. y Gálvez, M. A. 1998. Estimación de la variabilidad genética intrapoblacional mediante el uso de fragmentos de ADN amplificados al azar. *Agríc. Téc. Méx.* 24(1):83-89.
- Morales, J. L. 1996. Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate de Michoacán. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 96 p.
- Morales, J. L. 2000. La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) y la roña (*Sphaceloma perseae* Jenk) del aguacate de Michoacán, México: epidemiología, predicción y caracterización. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 137 p.
- Morales, G. J. L.; Montero, T. V.; Azpiroz, R. H. S. y Gálvez, M. A. 1998. Caracterización molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* en aguacate Hass procedente de Michoacán, México. XVII Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. Memoria. 345 p.
- Morales, G. J. L. y Vidales, A. F. 1994. Enfermedades del aguacate en Michoacán. CIPAC. INIFAP. SARH. Folleto para productores. Núm. 24. 1-6 pp.
- Nesher, I.; Barhoom, S. and Sharon, A. 2008. Cell cycle and cell death are not necessary for appressorium formation and plant infection in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *BMC. Biology.* 6:9-15.
- Perkins, D. D. 1987. Mating-type switching in filamentous ascomycetes. *Genetics.* 115:215-216.
- Raeder, U. and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 1:17-20.
- Rogers, D. J. and Tanimoto, T. T. 1960. A computer program for classifying plants. *Science.* 132:1115-1118.
- Rohlf, J. F. 1993. NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80. Department of Ecology and Evolution State University of New York. Stony Brook, New York, USA.
- Rojas, M. R. I.; Zavaleta, M. E.; Nieto, A. D. and Acosta, R. M. 2008. Virulence and genetic variation isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc. on mango (*Mangifera indica*) cv. Haden. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26:21-26.
- Smith, B. J. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Dis.* 74(1):69-76.
- Sreenivasaprasad, S.; Averil, E. B. and Mills, P. R. 1992. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Phys. Mol. Plant. Pathol.* 41:265-281.
- Stuber, C. W.; Wendel, J. F.; Goodman, M. M. and Smith, J. M. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). North Carolina State University. Raleigh, NC, USA. Technical bulletin. Num. 286.
- Xie, J.; Fu, Y.; Jiang, D.; Li, G.; Li, B.; Hsiang, T. and Peng, Y. 2008. Intergeneric transfer of ribosomal genes between two fungi. *BMC. Evol. Biol.* 8:72-87.
- Yakob, N.; Kobilier, I.; Dinooor, A. and Prusky, D. 2000. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1026-1030.
- Zhao, X.; Mehrabi, R. y Xu, R. 2007. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic cell.* 6:1701-1714.