

La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos

Edgar Saúl Rodríguez-López, Juan Manuel González-Prieto y Netzahualcoyotl Mayek-Pérez, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas, México CP 88710. Correspondencia: nmayek@ipn.mx

(Recibido: Mayo 12, 2008 Aceptado: Octubre 17, 2008)

Rodríguez-López, E.S., González-Prieto, J.M. y Mayek-Pérez, N. 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. Revista Mexicana de Fitopatología 27:53-63.

Resumen. El hongo *Colletotrichum gloeosporioides* es el agente causal de la antracnosis del aguacatero (*Persea americana*), enfermedad que ocasiona pérdidas cercanas al 20% de la producción. La infección inicia después del reconocimiento de alcoholes grasos y ceras en la superficie del fruto y dos horas más tarde los genes del hongo *CgMEKx* y *CgMEK1* se fosforilan. Dichos genes están involucrados en la diferenciación y germinación de conidios así como en la formación del apresorio. Además, los conidios secretan las proteínas CHIP2 y CHIP3, mismas que se relacionan con el contacto a la superficie del fruto. La activación del gen *cap20* ayuda al apresorio a desarrollarse después que se producen las hifas infectivas, para proveer de presión y secretar enzimas degradadoras de la pared celular. Los cambios en el pH del hospedante activan al gen *pac1* que induce la expresión del gen *pelB* y entonces se producen las enzimas poligalacturonasa y pectato-liasa. Los frutos de aguacate producen dieno y especies de oxígeno reactivas. Dichos compuestos provocan la quiescencia del hongo hasta que sus niveles disminuyen y el fruto madura. El proceso infectivo biotrófico produce la secreción de la proteína CIH1 y la etapa necrotrofica involucra las proteínas CLTA1 y CgDN3, mismas que se relacionan con la necrosis de tejidos en una etapa posterior.

Palabras clave adicionales: Antracnosis, transducción de señales.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del aguacatero y sus enfermedades. El cultivo de aguacatero (*Persea americana* Mill.) es una fuente económica muy importante para México, es de consumo creciente debido a su incorporación en la dieta y genera fuentes de empleo directos e indirectos en su cadena productiva. Según datos

Abstract. The fungus *Colletotrichum gloeosporioides* is the causal agent of anthracnose in avocado (*Persea americana*), disease which causes production losses near 20%. Fungal infection starts after recognition of fatty alcohols and waxes at the fruit surface, and two hours later *CgMEKx* and *CgMEK1* genes are phosphorylated. These genes are involved in differentiation and conidia germination as well as appressorium formation. In addition, proteins CHIP2 and CHIP3, related with fruit surface contact, are secreted. Activation of gene *cap20* helps the appressorium to develop after infective hyphae are produced, to provide pressure and secrete cell-wall degrading enzymes. Changes in host pH activate *pac1* gene which induces *pelB* gene expression and then polygalacturonase and pectate-lyase enzymes are produced. Avocado fruits produce diene and reactive-oxygen species. These compounds provoke fungal quiescence until their levels decrease as well fruit ripens. The biotrophic infective process produces secretion of CIH1 protein, and the necrotrophy stage involves proteins CLTA1 and CgDN3, which are related with tissue necrosis at a later stage.

Additional keywords: Anthracnose, transduction signals.

Abbreviated article.

INTRODUCTION

Avocado and diseases. Avocado (*Persea americana* Mill.) is an important economic source for Mexico, consumption is increasing as it has been incorporated into the diet and generates direct and indirect jobs in its production chain. Mexico ranked first in avocado production worldwide in 2007 (FAO, 2008); the state of Michoacan is the main producer followed by Morelos, Nayarit, Jalisco, and Guerrero. In 2007, the cultivated area was 117,300 ha with a production of more than a million ton (SAGARPA, 2007). Avocado is affected primarily by bacterial and fungal diseases, like powdery mildew (*Oidium* sp.) (Crane *et al.*, 2005); root rot (*Phytophthora cinnamomi* Rands) (Gabor *et al.*, 1990); black spot by *Cercospora purpurea* Cooke (Crane *et al.*, 2005); scab (*Elsinoe perseeae*) (Marroquín-Pimentel, 1999; Téliz and

de la FAO en el 2007, México ocupó el primer lugar en la producción de aguacate a nivel mundial (FAO, 2008); el principal estado productor es Michoacán, seguido por Morelos, Nayarit, Jalisco y Guerrero. La superficie cultivada de aguacatero en el 2007 fue cercana a las 117,300 ha, que corresponde a una producción de más de un millón de toneladas (SAGARPA, 2007). La creciente demanda del fruto de aguacate en el mundo ha sido factor importante para que se incremente la superficie cultivada. El aguacatero es afectado por varias enfermedades producidas por bacterias y hongos principalmente, entre las que destacan por su prevalencia y por los daños ocasionados al cultivo la cenicilla (*Oidium* sp.) que ocurre en épocas secas y provoca defoliación y caída de frutos pequeños (Crane *et al.*, 2005); la tristeza del aguacatero (*Phytophthora cinnamomi* Rands) que se presenta en cualquier etapa fenológica del cultivo (Gabor *et al.*, 1990); la mancha negra o por cercospora (*Cercospora purpurea* Cooke) que se presenta durante el verano y causa lesiones en el fruto que sirven como punto de entrada para otras enfermedades (Crane *et al.*, 2005); la roña (*Elsinoe perseae*) que infecta frutos en sus primeros estados fenológicos (Marroquín-Pimentel, 1999; Téliz y Mora, 2007); el anillamiento o pudrición del pedúnculo (*Diplodia* sp.) provocando caída del fruto en diversos estados de desarrollo (Salvador *et al.*, 1999; Téliz y Mora, 2007); la pudrición por armillaria (*Armillaria* sp.) que infecta principalmente raíces (Darley y Zentmyer, 1957); y la antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] (Podila *et al.*, 1993), enfermedad con prevalencia en temporadas lluviosas o con humedad relativa alta (Jeffries *et al.*, 1990). *C. gloeosporioides* es un patógeno de poscosecha del aguacatero que infecta principalmente frutos pequeños durante su crecimiento en los huertos (Yakoby *et al.*, 2001a). El hongo produce un apresorio que penetra el fruto degradando la cutícula y produciendo una hifa subcuticular latente que no se desarrolla hasta que el fruto madura. Los cambios fisiológicos en el fruto permiten la activación del patógeno quiescente (Benó y Prusky, 2000; Freeman *et al.*, 1995). La antracnosis ocasiona pérdidas sustanciales por decaimiento de frutos durante el almacenaje y comercialización (Freeman *et al.*, 1995) y se manifiesta con la presencia de manchas circulares café oscuras en el pericarpio y daños por ablandamiento y pudrición de la pulpa o mesocarpio (Prusky *et al.*, 2001; Yakoby *et al.*, 2000). La identificación de las especies del género *Colletotrichum* se basan principalmente en la morfología, el rango y especialización de los hospedantes y en el modo de parasitismo (Wharton y Diéguez, 2004). De esta manera, se han descrito 38 especies, ocho de las cuales poseen un estado sexual (Sutton, 1992). *Colletotrichum* spp. infecta diversas especies de manera individual o en asociación. Se han identificado infecciones mezcladas de diferentes especies de *Colletotrichum* en fresa (*Fragaria ananassa* Duch.) (Ureña *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004), en olivo (*Olea europaea* L.) (Talhinhas *et al.*, 2005), plantas forrajeras (*Stylosanthes* spp.) (Munaut *et al.*, 2002) y camote (*Dioscorea* spp.) (Abang et

Mora, 2007); peduncle rot or ring (*Diplodia* sp.) (Salvador *et al.*, 1999; Téliz and Mora, 2007); armillaria rot (*Armillaria* sp.) (Darley and Zentmyer, 1957); and anthracnose [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] (Podila *et al.*, 1993) (Jeffries *et al.*, 1990). *C. gloeosporioides* is a posharvest pathogen, it affects small fruits during development (Yakoby *et al.*, 2001a). The fungus produces an apresorium which penetrates fruit tissue and degrades the cuticle, then subcuticular hyphae are produced which remain latent until fruit ripening. Physiological fruit changes activate the fungus (Benó y Prusky, 2000; Freeman *et al.*, 1995) which affects fruits during storage and comercialization (Freeman *et al.*, 1995). Dark brown, circular spots develop in the pericarp as well as softening and rot of pulp and mesocarp (Prusky *et al.*, 2001; Yakoby *et al.*, 2000). Species identification of *Colletotrichum* is based primarily on morphology, host range and type of parasitism (Wharton and Diéguez, 2004). Thirty eight species have been described, eight of which have a sexual stage (Sutton, 1992). *Colletotrichum* species may infect diverse plants individually or in association. Anthracnose caused by *C. gloeosporioides* is one of the main diseases which affect fruit quality and may cause 20% loss, therefore, it is necessary to learn about molecular and biochemical aspects of the plant-pathogen interaction, as base for planning basic and applied research activities that might provide new perspectives for disease control.

AVOCADO ANTHRACNOSE: ETIOLOGY, EPIDEMIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY.

Avocado anthracnose shows both sexual [*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld and H. Schrenk] and asexual (*C. gloeosporioides*) stages. Fungal distribution is worldwide although it predominates in both tropical and subtropical climates (Xiao *et al.*, 2004). *In vitro*, the fungus shows slow development (Sreenivasaprasad and Talhinnas, 2005) and variable colony color (Ureña *et al.*, 2002; Zamora *et al.*, 2001). In addition, the fungus shows septate hyphae, ovoid apresoria with brown melanized color (Teliz and Mora, 2007). Conidia are hyaline, cylindrical and with obtuse apex (Cano *et al.*, 2004). The best sporulation of *C. gloeosporioides* has been reported in V8 medium under constant shaking at 25°C (Cascino *et al.*, 1990; Slade *et al.*, 1987). Under field conditions the fungus infects avocado at 27 ± 1°C (Freeman *et al.*, 1995) and relative humidity up 80% (Prusky *et al.*, 2001; Talhinnas *et al.*, 2001; Yakoby *et al.*, 2002). Although *C. gloeosporioides* affects different avocado tree parts, the syndrome is known as “viruela” (smallpox) due numerous small-round and brown spots when fruits are affected, and “clavo” (nail) when deep black lesions are present in fruits (Zamora *et al.*, 2001) and pink masses of spores are visible (Morales and Angel, 2007). The infective process by *C. gloeosporioides* starts with fixation of conidia to fruit surfaces. Conidia are released from acervuli and then dispersed by wind and/or rain. Conidia can adhere to fruits due to the presence of a mucilaginous layer

al., 2002). Contrariamente, en aguacatero y almendro (*Prunus dulces* Mill.) no se ha establecido dicha infección mixta por especies de este género (Freeman *et al.*, 1995, 2000). La antracnosis causada por *C. gloeosporioides* es una de las enfermedades principales que afecta la calidad del fruto y llega a causar pérdidas cercanas al 20%, por ello, se hace necesario conocer la interacción planta-patógeno en sus aspectos moleculares y bioquímicos que sirvan como punto de partida para plantear investigaciones básicas y aplicadas que provean nuevas perspectivas para el control de la enfermedad.

El agente causal de la antracnosis del aguacatero, *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. De acuerdo con el Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos de América (NCBI, 2007), *C. gloeosporioides* pertenece al reino Fungi; phylum Ascomycota; clase Sordariomycetes; subclase Sordariomycetes incertae sedis; orden Phyllachorales; familia Phyllachoraceae; género *Glomerella*; especie *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld y H. Schrenk. (fase teleomórfica, sexual o perfecta) o *Colletotrichum gloeosporioides* (fase anamórfica, asexual o imperfecta).

Etiología y epidemiología de la antracnosis del aguacatero.

C. gloeosporioides es un hongo de distribución cosmopolita y con predominancia en los trópicos y subtropicos (Xiao *et al.*, 2004). Este hongo muestra un crecimiento lento *in vitro* (Sreenivasaprasad y Talhinhos, 2005), las colonias presentan coloraciones de gris claro a gris oscuro, sin embargo, en agar avena el micelio es blanco, poco algodonoso y posee masas conidiales de color naranja (Zamora *et al.*, 2001; Ureña *et al.*, 2002); en papa-dextrosa agar, agar agua y agar avena pueden observarse la formación de apresorios (Mercia, 1999). El hongo posee hifas septadas (Roca *et al.*, 2000) y produce apresorios clavados, ovalados, algunas veces lobulados, melanizados de color café (Téliz y Mora, 2007), cuyas dimensiones varían de 4 a 12 μm de longitud (Sutton, 1980). Los conidios son hialinos, variables en tamaño, de forma cilíndrica y obtusos en el ápice, con medidas de 9 a 24 μm de largo y 3 a 4.5 μm de ancho (Cano *et al.*, 2004); en medio de agar simple el 98% son uninucleados, incrementándose en medios líquidos a los binucleados, principalmente (Jeffries *et al.*, 1990). La esporulación de *C. gloeosporioides* se ve favorecida cuando se cultiva en medio líquido V8 a 25°C bajo agitación constante (Cascino *et al.*, 1990; Slade *et al.*, 1987). El hongo puede infectar entre los 20 y 28°C, pero su temperatura óptima de crecimiento es de 27 \pm 1°C (Freeman *et al.*, 1995) en ambientes con humedad relativa de 80 a 100% (Prusky *et al.*, 2001; Talhinhos *et al.*, 2005; Yakoby *et al.*, 2002). El pH óptimo de crecimiento del hongo es de 5.5 a 7 (Drori *et al.*, 2003; Prusky *et al.*, 2001; Villanueva-Arce *et al.*, 2004). La antracnosis se manifiesta en diversas partes del aguacatero (Agrios, 1988); cuando ataca frutos en desarrollo se le conoce como “viruela” y al inicio se observan manchas circulares translúcidas redondas, que posteriormente cambian a café oscuro y pueden ser numerosas; cuando infecta frutos

constituted by polysaccharides and glycoproteins from acervuli (Teliz and Mora, 2007). Mannoproteins provide hydrophobic capability to conidia adhesion by a mechanism which has been described in *C. lindemuthianum* (Sacc. and Magnus.) Lams. - Scrib. (O'Connell *et al.*, 1996). *C. trifolii* Bain and Essary uses cutinases and sterases for adhesion and penetration (Dickman *et al.*, 2003). The second infection step consists on signal and conidia germination. Conidia must be recognized by cuticle waxes and ethylene synthesis, when fruits start ripening, for appresoria formation (Kim *et al.*, 1998; 2002b). Spore germination can be divided in four major steps: stimulus reception, signal transduction to the nucleus, genetic expression changes, and changes in phenotype, shape or function of cells (Ruiz-Herrera, 1993). Signal transduction based on protein-kinases activated by mitogen (MAPK), constitutes one of the most conserved signal pathways in eucaryotic organisms. MAPK involves three phosphorylated (kinases) proteins which act in sequence: MAPK, MAPK-kinase (MEK), and MEK kinase (MEKK). These proteins can detect extracellular signals which are transduced to the nucleus for control of gene expression. Different genes have been identified to be involved in pathogenesis of *C. gloeosporioides* in avocado fruits. Recognition and conidia germination induce changes in polarity, cell wall structure, and preferential accumulation of some substances such as F-actine for further events such as septum formation, cell division, conidia differentiation, and appresorium synthesis. Calmoduline and calmoduline-kinase (CaM, CamK) as well as Ca²⁺ are involved in the early response of conidia to their interaction with the host plant (Dayton *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Prusky *et al.*, 2000). A group of *chip* (*Colletotrichum* hard-surface induced proteins) genes have been identified in the interaction *Colletotrichum*-avocado. One of them, *chip1* codifies for UBC1g protein that could be associated to germination and differentiation of appresoria (Prusky *et al.*, 2000). After stimulus by ethylene and waxes in the avocado fruit surface, conidia produce a germ tube which grows to form an appresorium (Sexton and Howlett, 2006). At least, aliphatic alcohols with 30 to 32 carbons have been identified as elicitors of appresorium formation as well as 1.0 $\mu\text{L L}^{-1}$ of ethylene *in vitro* (Flaishman and Kolattukudy, 1994). Appresorium synthesis is governed by genes as *cap20* which induces the synthesis of CAP20 protein (Cheng *et al.*, 1995) although other genes could be needed to this event such as *cap3*, *cap5*, and *cap22* (Hwang *et al.*, 1995). Phosphorylated protein-kinases MAPK and MEK are also needed in *C. gloeosporioides* (Kim *et al.*, 1998). For example, protein CgMEK1 interacts with MAPK1 (Kim *et al.*, 2000a) and other redundant kinase (CgMEKx is also involved in the process) (Fig. 1). From the appresorium pore, a penetration hypha is produced, then it penetrates the cuticle of the fruit epidermis (Yakoby *et al.*, 2002), which needs a mechanical force to increase turgor pressure as well as enzymatic action by cell-wall degrading enzymes (CWDE) (Wei *et al.*, 2002, 2004). Turgor pressure is increased as glycerol concentrations

maduros se le conoce como “clavo”, mostrando la presencia de lesiones negras hundidas, circulares o irregulares (Zamora *et al.*, 2001) y masas de esporas color rosado (Morales y Ángel, 2007); en las hojas se manifiesta como manchas de color café con un halo clorótico y puede provocar defoliación si la incidencia es alta; en las flores aparece como tizón y provoca la caída o aborto de fruto; en las ramas se observan manchas circulares color café o púrpura que rápidamente se necrosan (Morales y Ángel, 2007; Téliz y Mora, 2007).

Bioquímica y genética molecular de la infección de *C. gloeosporioides* en aguacatero. Fijación de los conidios en la superficie. Los conidios de *C. gloeosporioides* se producen dentro de acérvulos, mismos que son la fuente principal de inóculo para el desarrollo y diseminación de la enfermedad (Jeffries *et al.*, 1990; Latunde, 2001), su dispersión puede ser por aire o salpicaduras de lluvia (Téliz y Mora, 2007); al dispersarse los conidios se adhieren al hospedero por medio de una capa mucilaginosa compuesta de polisacáridos y glucoproteínas presente en el acérvulo (Téliz y Mora, 2007), la cual se ha observado en el tubo germinativo y el apresorio de *C. gloeosporioides* cuando infecta mango (*Mangifera indica* L.) (Ruiz, 2001). En *Candida albicans* (C.P. Robin Berkhout, las manoproteínas son las responsables de la hidrofobicidad en la superficie celular y controlan la adhesión de este patógeno al hospedero (Hazen y Hazen, 1992). Se sugiere que el mecanismo anterior también opera en *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magnus) Lams.-Scrib. (O’Connell *et al.*, 1996) y puede ser extrapolado a *C. gloeosporioides*. Adicionalmente, *Colletotrichum trifolii* Bain y Essary contiene enzimas cutinasas y esterases que le ayudan en la adhesión y penetración del hongo (Dickman *et al.*, 2003). Señalización y germinación de los conidios. Una vez que el conidio de *C. gloeosporioides* se encuentra en la superficie, éste responde a las ceras epiculares del hospedante y al etileno, coincidiendo con la maduración del fruto; para tal efecto la señal del hospedante es el incremento en la producción de etileno en concentraciones internas cercanas a $0.2 \mu\text{L L}^{-1}$, requiriendo el contacto del conidio con la superficie por un período de 2 h (Kim *et al.*, 1998, 2000b), necesarias para inducir la germinación y formación del apresorio. Ruiz-Herrera en 1993 describió que los procesos morfogenéticos o de diferenciación celular como la germinación de las esporas, pueden dividirse en cuatro etapas generales: Recepción del estímulo, transducción de la señal al núcleo, cambio en la expresión génica y finalmente, cambio en el fenotipo, forma o función, de la célula. Dentro de la transducción de la señal, la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) constituye una de las rutas de señalización más conservadas en los organismos eucariotes; involucra tres proteínas modificadas por fosforilación (cinasas) que actúan en orden secuencial: La MAPK, MAPK cinasa (MEK) y MEK cinasa (MEKK), las cuales desempeñan una función importante en la detección de señales extracelulares, transduciéndolas al núcleo para controlar la expresión de los genes. En *C. gloeosporioides*

becomes greater in host cells of *C. lindemuthianum*. Some *Colletotrichum* species penetrate the lumen host by using one large-primary hypha (LPH), but both, cell plasmalemma and protoplast remain undisturbed. The asymptomatic phase of anthracnose occurs 40-72 hours after inoculation. Then, LPH increases its size 50-200 fold due to acquired nutriment from the host before necrosis (Latunde-Dada, 2001). In this biotrophic phase, the fungus secretes C1H1 glycoprotein (Mendgen and Hahn, 2002), while gene *cgDN3* plays a major role for intracellular development as well as the development of necrosis (Stephenson *et al.*, 2000). LPH is associated to the change from biotrophic to a necrotrophic status (Latunde-Dada, 2001) after production of a secondary hypha which degrades cell walls near the infection site (O’Connell *et al.*, 1996); the gene *CLTA1* that codifies for GAL4 protein is involved in this change (Dufresne *et al.*, 2000). The extracellular matrix of the germination tube in *C. lindemuthianum* is very similar to the matrix of the appressorium, have similar carbohydrates and glycoproteins such as galactose, mannose, and N-acetylglucosamine as well proteins; while intracellular hyphae do not have galactose, and their proteins are different from those reported for the germination tube and appressorium; also, they have lower concentration of carbohydrates (O’Connell *et al.*, 1996). Nitrogen sources for early pathogen growth is probably supplied from fungal protease activity which breaks glycoprotein structure of plant cell walls (Driori *et al.*, 2003). In this way, *C. gloeosporioides* uses some CWDEs as polygalacturonase (PG), pectin-lyase, pectin-methyl-sterase and pectate-lyase (PL) (Prusky *et al.*, 2001). PG is secreted when pH changes from 5.0 to 5.8 (Yakoby *et al.*, 2000) and PL is secreted at pH greater than 6.0 and after genes *pelB* and *pacI* are activated (Wattad *et al.*, 1994). The gene *pacI* is the first candidate to participate in the regulation of enzymatic secretion by *C. gloeosporioides*. There are other genes probably implicated in pathogenicity such as *CHIP2* which codifies for one protein related to DNA-binding and nuclear localization, and *CHIP3* which has nine trans-membrane domains. Wharton and Dieguez (2004) indicated that the most of postharvest resistance cases can be named as “dynamical incompatibility”, where host resistance prevents or delays pathogen growth under specific physiological conditions. Plant-pathogen interaction trends towards compatibility when host physiology inhibits resistance. Resistance of immature avocado fruit to *Colletotrichum* is based on pre-formed compounds at the pericarp (Podila *et al.*, 1993). When fruits start ripening, antifungal compounds (monoene and diene) are reduced and then the fungus which had been dormant starts the infective process (Morrissey and Osbourn, 1999; Yakoby *et al.*, 2001b). When diene concentrations increase epicatequin biosynthesis genes are elicited (Beno and Prusky, 2000), enzymes 9-denaturase, 12-denaturase and elongase are activated, and genes of the phenylpropanoid pathway are transcribed such as phenylalanine ammonio-lyase (PAL) increasing the resistance of avocado fruit to anthracnose.

las MAPK actúan en las etapas donde ocurren re-arreglos de actina en el citoesqueleto, tales como la división celular y la germinación, que a su vez son fenómenos asociados con la polaridad y con la diferenciación del tubo germinativo (Kim *et al.*, 2000b; Prusky *et al.*, 2000). En los conidios de *C. gloeosporioides* el contacto con la superficie induce la acumulación preferencial de F-actina en uno de los núcleos hijos y la formación del septo sirve para completar la división celular posterior a la germinación (Fig. 1). En mutantes afectadas en el gen *CgMEK1*, que codifica para una MEK, bajo la ausencia de nutrientes o señales del hospedante, la distribución polarizada de F-actina y los siguientes eventos (formación del septo y división celular, diferenciación de los conidios y formación de apesorio) se ven afectados, indicando que *CgMEK1* puede fosforilar a una MEKK involucrada en este proceso. En cambio, en presencia de las señales del hospedante (ceras superficiales y etileno), o la adición de nutrientes externos (como el extracto de levadura), las mutantes afectadas en el gen *CgMEK1* experimentan una división celular normal y la germinación de conidios, pero no la formación del apesorio (Kim *et al.*, 2000a). La calmodulina y calmodulina cinasa (CaM, CaMK, respectivamente) están involucradas en señales tempranas de transducción y probablemente activan la expresión de los genes que estimulan a los conidios para responder a las

Oxygen-reactive species (ROS) are significantly increased in avocado fruit after inoculation with *C. gloeosporioides*, suggesting that ROS activates the phenyl-propanoid pathway and synthesis of diene for fruit resistance (Yakoby *et al.*, 2002). In the same way, ROS are quickly produced at the extra-cellular surface of the plasmatic membrane due to reduction of one electron from molecular oxygen, transference of electrons from NADPH oxidase (donor) acidifies cellular cytosol and reduces the plasmatic membrane potential. Later, *C. gloeosporioides* causes depolarization and permeability changes of the cell membrane contributing to amplification of signals at the phenyl-propanoid pathway (Flaishman and Kolattukudy, 1994). Finally, different phosphorylation and de-phosphorylation events can positively regulate ROS induction in avocado tissue (Beno and Prusky, 2000).

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Crop protection could increase crop productivity worldwide. Despite that fungicides provide successful management of fungal pathogens, their indiscriminate use affects the environment and human health. *C. gloeosporioides* causes significant yield losses in avocado, so we need to learn more about its biology, genetics, and host-pathogen interactions to implement better crop management practices in order to avoid or reduce the damage by this pathogen. Some aspects

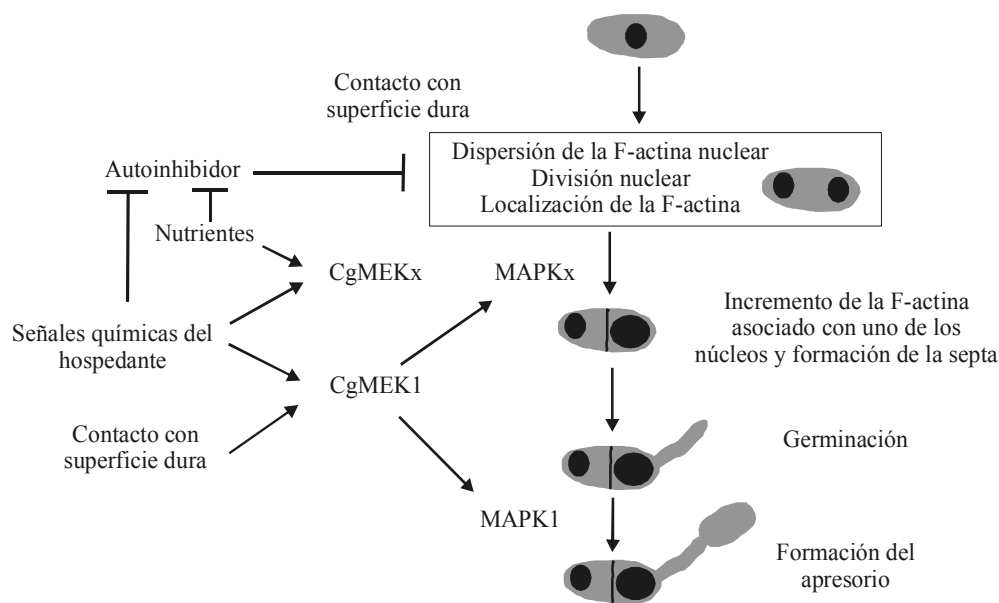


Fig. 1. Procesos de modulación del crecimiento y desarrollo de los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* a partir del contacto con la superficie dura del fruto del aguacatero (Hwang *et al.*, 1995. The Plant Cell 12:1331-1343. Con el permiso de P. Kolattukudy-Dean, Burnett College of Biomedical Sciences. University of Central Florida. Orlando, FL., USA).

Fig. 1. Modulation process of growth and development of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*, after contact with the hard surface of avocado fruit (Hwang *et al.*, 1995. The Plant Cell 12:1331-1343. Permission by P. Kolattukudy-Dean).

señales químicas del hospedante (Dayton *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Prusky *et al.*, 2000), ya que el uso de un antagonista de CaM, compuesto 48/80, inhibe tanto la germinación de los conidios como la formación del apresorio en *C. trifolii* (Liu y Kolattukudy, 1999), sugiriendo que tanto el Ca²⁺ y la CaM están involucrados en la germinación y los eventos posteriores a ella (Kim *et al.*, 1998). Varios de los genes implicados en la inducción de la germinación se han identificado por despliegue diferencial y se han denominado proteínas de *Colletotrichum* inducidas por superficie dura (*chip*). El gen *chip1* codifica para una enzima conjugada de ubiquitinación de 147 aminoácidos denominada UBC1cg, misma que se detectó por Northern blot a las 2 h de contacto, y cuyo transcrito disminuye después de 6 h. La proteína UBC1cg probablemente se encuentra involucrada en la reprogramación de la síntesis de las proteínas necesarias para la germinación y la diferenciación del apresorio (Prusky *et al.*, 2000). **Formación del apresorio.** Como se mencionó, en respuesta al etileno y la capa cerosa de la superficie del aguacate, los conidios al germinar producen un tubo germinativo que se hincha en el ápice para formar una estructura denominada apresorio, el cual se adhiere firmemente a la superficie de la planta. El apresorio maduro es una estructura asimétrica, polarizada, con un domo superior melanizado y una región basal plana que contiene un poro complejo (Latunde-Dada, 2001; O'Connell *et al.*, 1996; Prusky *et al.*, 1996, 2000; Sexton y Howlett, 2006). Al separar cromatográficamente las ceras epiculares, se han identificado fracciones de alcoholes alifáticos de cadena larga (de 30 a 32 carbonos) como inductores de la formación de apresorio. Sin embargo, las ceras de plantas tales como *Senecio odoris* (Forssk.) Delers y *Crassula argentea* Thunb, que tienen un contenido alto de alcoholes alifáticos, inhiben la formación del apresorio, desconociéndose al componente responsable de dicho efecto (Podila *et al.*, 1993). Adicionalmente, en experimentos *in vitro*, las concentraciones menores o iguales a 1.0 µL de etileno L⁻¹ inducen la formación de apresorios en *C. gloeosporioides* y *C. musae* Berk y Curt en aguacate y banano (*Musa* spp.), respectivamente (Flaishman y Kolattukudy, 1994). Durante la formación del apresorio los conidios de *C. gloeosporioides* secretan la proteína CAP20 (Cheng *et al.*, 1995); el gen *cap20* sólo posee homología con el gen MPG1, involucrado en la formación del apresorio en *Magnaporthe grisea* [(T.T. Hebert) Yaegashi y Udagawa] Marasas. En *C. gloeosporioides*, *cap20* se expresa únicamente durante la formación del apresorio y no durante la germinación de los conidios; mutantes afectadas en este gen producen la formación de un apresorio no funcional. Sin embargo, aparentemente la formación del apresorio en este hongo, requiere además de la expresión de otros genes tales como *cap3*, *cap5* y *cap22* (Hwang *et al.*, 1995). El uso de inhibidores de las proteínas cinasas (MAPK y MEK) y proteínas fosfatasa, sugieren que la fosforilación de éstas proteínas está involucrada en la inducción de la formación del apresorio en *C. gloeosporioides* (Kim *et al.*, 1998). La

of anthracnose pathogenesis cycle remain unknown, therefore, there is the need to investigate some biochemical and molecular events in the pathosystem. We can use the information derived from other related fungal species, like basidiomycetes or ascomycetes to infer and understand our model. We know a great deal about strategies for analysis of proteins and genes and their roles in pathogenesis, signal transduction ways, stimulus reception, and changes in genetic expression. An advantage for molecular studies in *C. gloeosporioides*, is the availability of a genetic transformation system, which allow us to produce null-mutants to test the role of genes on specific cellular events. We are also capable of implementing methods for global analysis of genetic expression profiles of pathogens or during the plant-pathogen interaction, such as differential display, subtractive libraries, *etc.* It is imperative to start the use of genomic strategies as sequencing and annotation of *C. gloeosporioides* genome, for comparison with other known fungal genomes, and then establish synteny values among them. Other current strategies as microarrays, proteomics, and metabolomics, will be useful to identify ortholog or specific genes in species also involved in pathogenesis, by using bioinformatics tools and comparative genomics. On the other hand, the use of molecular markers can help to measure bio-geographic diversity, and to identify allele variants (pathotypes) in *C. gloeosporioides*, as well as new resistance sources in avocado germplasm.

End of the abbreviated article.

formación del apresorio en *C. gloeosporioides* es consecuencia de la respuesta a las señales químicas del hospedero y contacto con la superficie dura del mismo, mediante la activación de la proteína CgMEK1, la cual a su vez interactúa con la proteína MAPK1 (Kim *et al.*, 2000a). Se sugiere la presencia de otra proteína cinasa con función redundante a CgMEK1, llamada CgMEKx, la cual se propone puede modificar a otra posible cinasa MAPKx (Fig. 1), cuya cascada de fosforilaciones está relacionada con la formación del septo y germinación en *C. gloeosporioides*. Los nutrientes aparentemente activan a la proteína CgMEKx pero ésta no activa a MAPK1, que está selectivamente involucrada en la regulación de la formación del apresorio (Kim *et al.*, 2000a). Al utilizar un inhibidor de CaMK (KN93) se afecta la melanización y formación del apresorio, cuando se utiliza un quelante (U73122) a una concentración de 64 nM para los iones de Ca²⁺, se inhibe completamente la germinación y por consecuencia la formación del apresorio (Kim *et al.*, 1998; Prusky *et al.*, 2000). **Penetración del apresorio.** La penetración al fruto del aguacate inicia con la aparición de la hifa de penetración a través de un poro que se encuentra en la base del apresorio y se introduce a través de la cutícula de la pared celular de la planta (O'Connell *et al.*, 1996; Yakoby *et al.*, 2002). En *C. gloeosporioides* se postula que la penetración de la hifa en la cutícula y células epidérmicas del hospedero, involucra la fuerza mecánica a través de la alta

presión de turgencia así como la acción enzimática mediante la secreción de “enzimas degradadoras de la pared celular” (CWDE) (Prusky *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2002, 2004). En *C. lindemuthianum*, la presión de turgencia se genera al incrementarse la concentración molar de glicerol, mismo que es retenido por la célula y es impermeable a la melanina. En algunas especies hemibiotróficas de *Colletotrichum*, la penetración de las células epidérmicas ocurre mediante una hifa primara larga (LPH) dentro del lumen de la célula, sin perturbar el plasmalema o al protoplasto del hospedero. La fase asintomática de la antracnosis cursa a partir de las 48 a 72 h después de la inoculación, donde el plasmalema y el tonoplasto de las células infectadas continúan funcionales; en esta fase, la LPH incrementa su volumen de 50 a 200 veces formando una vesícula que indica la adquisición acelerada de fluidos y nutrimentos del hospedero infectado antes de ser necrosado (Latunde-Dada, 2001). En esta fase biotrófica del hongo se sintetiza la glicoproteína CIH1, cuya expresión se reprime cuando se inicia el desarrollo necrotrófico (Hahn y Mendgen, 2001; Mendgen y Hahn, 2002), mientras que el gen *CgDN3* expresado durante la fase temprana del crecimiento biotrófico, es indispensable para el desarrollo intracelular del hongo y evadir la respuesta de hipersensibilidad en *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. (Stephenson *et al.*, 2000). *CgDN3* no está directamente implicado en la patogenicidad, pero si lo está en la aparición de lesiones necrotróficas en el hospedante después de la inoculación del hongo mediante punción de la superficie del fruto (Hahn y Mendgen, 2001). Posteriormente la LPH se ramifica originando una hifa delgada secundaria asociada al cambio del crecimiento biotrófico a la infección necrotrofa del hongo (Latunde-Dada, 2001; Wei *et al.*, 2004). Después de 48 h de la penetración inicial en *C. lindemuthianum* y de 96 h en *C. destructivum* O'Hara, *C. truncatum* (Schwein.) Andrus y W.D. Moore y *C. linicola* Pethybr. y Laff (Latunde-Dada, 2001) se desarrollan hifas secundarias necrotrofas que degradan las paredes celulares cercanas al sitio de la infección (O'Connell *et al.*, 1996). El cambio a la fase necrotrofica involucra cambios nutrimentales de modo que la habilidad para que el patógeno utilice los constituyentes de la planta, se hace más eficiente mediante la activación de las rutas catabólicas, tal es el caso del gen *CLTA1* que codifica para la proteína GAL4, involucrado en el cambio entre la condición biotrófica y la necrotrofica durante el proceso de infección (Dufresne *et al.*, 2000). En *C. lindemuthianum* se estudiaron los componentes de la superficie de los conidios, el tubo de germinación, el apresorio y la hifa intracelular, utilizando rodamina y fluoresceína conjugada con lectinas para identificar la constitución de los carbohidratos y anticuerpos monoclonales para determinar proteínas y carbohidratos. Al realizar los análisis con las lectinas, los resultados mostraron que la matriz extracelular del tubo de germinación es muy similar a la del apresorio en la composición de carbohidratos y glucoproteínas, ya que están presentes galactosa, manosa y N-acetilglucosamina; sin

embargo difiere de la hifa intracelular que no posee galactosa. Con los anticuerpos monoclonales utilizados no se identificaron proteínas en la superficie del conidio, por otro lado se evidenció que la presencia de carbohidratos es mayor con respecto a los otros componentes analizados. El tubo de germinación, el apresorio y la hifa intracelular presentaron cantidades similares de proteínas, sin embargo, las proteínas identificadas en la hifa intracelular son diferentes de las detectadas en el tubo de germinación y el apresorio. Finalmente, la hifa intracelular es la estructura que presenta la menor cantidad de carbohidratos. Las características propias de la hifa intracelular sugieren cierta especialización del hongo durante la fase biotrófica (O'Connell *et al.*, 1996). Las fuentes de nitrógeno necesarias para el crecimiento inicial del patógeno probablemente resultan de la actividad de las proteasas del hongo que rompen las estructuras de las glicoproteínas de la pared celular vegetal (Drori *et al.*, 2003); las CWDE en *C. gloeosporioides* son la poligalacturonasa (PG), pectina liasa, pectin metil-esterasa y la pectato liasa (PL) (Drori *et al.*, 2003; Prusky *et al.*, 2001). El cambio gradual del pH (5.0 a 5.8) en el área de infección provoca la secreción de PG (Yakoby *et al.*, 2000), mientras que la secreción de PL requiere un pH superior a 6.0, la cual está determinada por la transcripción del gen *pelB*, que responde a cambios de pH en el hospedante (Drori *et al.*, 2003; Wattad *et al.*, 1994), así como la expresión del gen *pac1* [homólogo al gen *pacC* en *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Wint.]; *pac1* participa en rutas de señalización y en la regulación de la transcripción de genes dependientes del pH. Los dominios de “dedos de zinc” y la función central que desempeña en la vía dependiente de pH, convierten al homólogo de *pacC* de *C. gloeosporioides* en el primer candidato para participar activamente en la regulación del proceso de secreción enzimática en este hongo. La patogenicidad de *C. gloeosporioides* depende de su habilidad para secretar PL y no para expresar *pelB* (Prusky *et al.*, 2001). Cuando el amonio se acumula, el pH aumenta, por consiguiente la virulencia de *C. gloeosporioides* se ve incrementada (Prusky *et al.*, 2001). De los genes implicados en la inducción de la germinación que se identificaron por despliegue diferencial, *CHIP2* es un gen que codifica para una proteína de probable unión al DNA y de localización nuclear, mientras que el producto génico de *CHIP3* contiene nueve dominios transmembranales. La interrupción de ambos genes en *C. gloeosporioides* no muestran diferencias morfológicas y patogénicas en aguacate en comparación con cepas silvestres, por tanto, las proteínas *CHIP2* y *CHIP3* no son esenciales para la patogenicidad como se había planteado y se sugieren dos posibilidades, una de ellas es que son genes con función “redundante” y otra es que son proteínas implicadas en otros procesos celulares (Kim *et al.*, 2000b). Mecanismo de defensa del aguacate. La mayoría de la resistencia a patógenos poscosecha en frutas y vegetales puede describirse como una “incompatibilidad dinámica” (Prusky *et al.*, 2000; Wharton y Diéguez, 2004). La respuesta del hospedante hacia el patógeno para activar sus genes de

avirulencia, previene o retarda el crecimiento del patógeno bajo condiciones fisiológicas específicas (Wharton y Diéguez, 2004). El estado fisiológico en el hospedero varía por diversos factores, entre ellos la maduración, el almacenaje, el daño mecánico, las temperaturas extremas y la anoxia. Cuando los cambios fisiológicos en el hospedero inhiben sus propios mecanismos de defensa en respuesta a las actividades del patógeno, la interacción patógeno-hospedante es compatible. La resistencia del fruto inmaduro de aguacate al ataque de *Colletotrichum* se ha asociado con la presencia de compuestos preformados en la cáscara o pericarpio (Podila *et al.*, 1993). Con frecuencia este hongo infecta frutos inmaduros y permanece latente hasta que disminuyen las concentraciones de compuestos antifúngicos a niveles no tóxicos, lo que en aguacate coincide con la maduración del fruto (Beno y Prusky, 2000; Wharton y Diéguez, 2004; Yakoby *et al.*, 2001b). El pericarpio del aguacate contiene monoenos (1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadeca-16-eno) y dienos y (1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12,16-dieno). Los niveles de estos compuestos disminuyen durante la maduración del fruto y esto permite la susceptibilidad al ataque de hongos (Morrissey y Osbourn, 1999). Se han sugerido cuatro factores que proporcionan resistencia al fruto inmaduro de aguacate al ataque de hongos: Escasez de los nutrimentos requeridos por el patógeno, compuestos antifúngicos preformados, compuestos antifúngicos inducidos y la ausencia de activación que proporcionan los factores de patogenicidad del hongo (Yakoby *et al.*, 2001a,b; 2002). El incremento en la concentración del dieno es paralelo a la activación transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de la epicatequina. Este efecto no ocurre durante la maduración del fruto (Beno y Prusky, 2000). Los niveles de dieno dependen de la síntesis y el metabolismo de varios compuestos, incluyendo la activación de las enzimas 9 desaturasa, 12 desaturasa y el ácido graso elongasa. La activación transcripcional de genes codificantes de proteínas de la síntesis de epicatequina en la ruta fenilpropanoide, tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL), causa el incremento en la síntesis del dieno y la correspondiente resistencia del fruto a la antracnosis (Yakoby *et al.*, 2002). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se incrementan significativamente en el fruto de aguacate con la inoculación de conidios de *C. gloeosporioides*. Lo anterior sugiere que la infección quiescente ocurre por la producción local de ROS con lo que se activa la ruta fenilpropanoide, y subsecuentemente se incrementan los niveles del dieno antifúngico que inhiben el ataque del hongo (Yakoby *et al.*, 2002). En el pericarpio del aguacate, de manera similar a otros órganos de la planta, se reconoce a los patógenos o los elicitores de la pared celular en etapas tempranas del proceso de infección, mediante la generación rápida de ROS. La síntesis de ROS ocurre en la superficie extracelular de la membrana plasmática por la reducción de un electrón del oxígeno molecular. La transferencia de electrones del donador citosólico (NADPH oxidasa) al aceptor en la superficie extracelular de la membrana

plasmática conduce a la acidificación del citosol, la alcalinización del medio extracelular y la disminución del potencial de la membrana plasmática (Beno y Prusky, 2000; Yakoby *et al.*, 2002). Estos cambios inducidos por la antracnosis provocan diversos eventos celulares tempranos que incluyen la depolarización de la membrana y cambios en su permeabilidad en la misma para los iones de Ca^{+2} , protones, iones de Cl^{-1} y K^{+1} , contribuyendo en la transducción y amplificación de las señales de la ruta fenilpropanoide. De esta forma se regulan los niveles de dieno antifúngico y se inhibe el desarrollo del hongo, produciendo su latencia (Flaishman y Kolattukudy, 1994). Sin embargo, los inhibidores de proteínas cinasas y fosfatasa, reducen significativamente la producción de ROS en cultivos celulares de aguacate inducidos con paredes celulares de *Colletotrichum*. Entonces se puede deducir que diferentes procesos de fosforilación y defosforilación pueden regular positivamente la inducción de ROS en tejidos de aguacate (Beno y Prusky, 2000).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El incremento mundial de la población y la disminución de superficie de suelo cultivable, obliga a un mejor aprovechamiento de los recursos genéticos disponibles haciendo indispensable la protección de los cultivos a enfermedades, por consecuencia una mejora sustancial a la producción agrícola. El uso de fungicidas para el control de enfermedades ha mostrado ser exitoso por un tiempo, pero su uso continuo provoca severos daños a la salud y al ambiente. *C. gloeosporioides* causa pérdidas económicas considerables en el cultivo del aguacatero, por lo que resulta indispensable conocer la biología y la genética del patógeno, así como la interacción en el patosistema hongo-hospedante. Como sucede con otros hongos utilizados como modelo de estudio para el análisis de la patogénesis, en *C. gloeosporioides* falta conocer con precisión los mecanismos que operan durante las diferentes etapas del proceso infectivo, particularmente en aguacate. Las evidencias mostradas indican que es necesario indagar aún más sobre aspectos bioquímicos y moleculares para un mayor entendimiento del proceso en estudio. Conforme se ha desarrollado el estudio de la patogénesis en hongos, se ha evidenciado que los actores y el escenario en el cual se lleva a cabo no son muy diversos, esto puede deberse a que el grado de conservación es considerable en este grupo de organismos eucariotes, y gracias a ello, los estudios realizados en especies diferentes de un mismo género, de una misma clase (ascomicetos, basidiomicetos, *etc.*), o en aquellos organismos que presentan una manera de vida similar, nos proveen de información para tener un acercamiento, para tratar de inferir y entender lo que ocurre en el modelo de estudio seleccionado; sin embargo, no se puede pasar inadvertido que como individuos que son, incluso a nivel de especie, los hongos también poseen características que los hacen únicos y pueden tener actores protagónicos específicos en el complejo proceso de la patogénesis. Tomando en cuenta lo anterior, existen diferentes

estrategias para aumentar el conocimiento en esta área, desde verificar si los genes o proteínas evidenciados en otros hongos por su participación en alguna de las diferentes etapas generales de la patogénesis, como la recepción del estímulo, las vías de transducción de señales y los cambios en la expresión génica, están presentes y poseen la misma función en *C. gloeosporioides*, hasta el establecimiento de técnicas para la búsqueda de participantes anónimos en dicho proceso. El hecho de que *C. gloeosporioides* posea un sistema de transformación genética, hace factible el estudio de cualquier gen mediante la elaboración de mutantes nulas, y así poder comprobar su participación, o la de una vía de transducción de señales, en un proceso celular dado. Aunado a lo anterior, se pueden implementar métodos de análisis global para determinar los perfiles de expresión génica en el patógeno o su interacción con el hospedero utilizando condiciones contrastantes de patogénesis, estos métodos pueden ser el despliegue diferencial, la creación de bibliotecas sustractivas, entre otras. En este mismo sentido, y acorde a la actualidad, es imperante la aplicación de estrategias genómicas como la secuenciación y anotación del genoma de *C. gloeosporioides* y su comparación con otros genomas fúngicos ya conocidos, para poder establecer el nivel de similitud entre ellos, además de los análisis de expresión del genoma como los microarreglos, la proteómica y la metabolómica, con la finalidad de determinar la presencia de genes ortólogos, o específicos del hongo, que estén involucrados en patogénesis, mediante el empleo de herramientas bioinformáticas y la genómica comparativa. El uso de técnicas basadas en marcadores moleculares pueden indicar el impacto de la diversidad biogeográfica con base en la distribución de las poblaciones del patógeno, o posibles variantes alélicas asociadas directamente a la patogenicidad y agresividad específicas para *C. gloeosporioides*, como en el caso del locus OPC-5 identificado por medio de RAPD en fresa (Xiao *et al.*, 2004), así como la posibilidad de la identificación y uso de nuevas variedades de aguacatero con resistencia genética a patógenos, puesto que *C. gloeosporioides* ha demostrado ser capaz de adaptarse a nuevos hospedantes (Latunde-Dada, 2001; Mercia, 1999).

Agradecimientos. E.S. Rodríguez-López agradece el apoyo económico del CONACYT y del Instituto Politécnico Nacional para la realización de sus estudios de maestría en el Centro de Biotecnología Genómica. J.M. González-Prieto y N. Mayek-Pérez son becarios del SNI y EDI y COFAA-IPN.

LITERATURA CITADA

- Abang, M.M., Winter, S., Green, K.R., Hoffmann, P., Mignouna, H.D., and Wolf, G.A. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology* 51:63-71.
- Agrios, G.N. 1988. *Plant Pathology*. Third Edition. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA. 803 p.
- Beno, D.B., and Prusky, D. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology* 90:553-559.
- Cascino, J.J., Harris, R.F., Smith, C.S., and Andrews, J.H. 1990. Spore yield and microcycle conidiation of *Colletotrichum gloeosporioides* in liquid culture. *Applied and Environmental Microbiology* 56:2303-2310.
- Cano, J., Guarro, J., and Gené, J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology* 42:2450-2454.
- Cheng, H., Flaishman, M., and Kolattukudy, P. 1995. Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *The Plant Cell* 7:183-193.
- Crane, J., Belerdi, C., and Maguire, I. 2005. Avocado growing in the Florida Home landscape. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. Homestead, Florida, USA. 16 p.
- Darley, E.F., and Zentmyer, G.A. 1957. Oak root fungus in avocados. *California Avocado Society* 41:80-81.
- Dayton, J., Sumi, M., Nanthakumar, N., and Means, A. 1997. Expression of a constitutively active Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase in *Aspergillus nidulans* spores prevents germination and entry into the cell cycle. *The Journal of Biological Chemistry* 272:3223-3230.
- Dickman, M.B., Ha, Y.S., Adams, B., and Huang, C. 2003. A protein kinase from *Colletotrichum trifolii* is induced by plant cutin and is required for appressorium formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:411-421.
- Drori, N., Kramer, H., Haimovch, Rollins, J., Dinooor, A., Ocoton, Y., Pines, O., and Prusky, D. 2003. External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3258-3262.
- Dufresne, M., Perfect, S., Pellier, A.L., Bailey, J.A., and Langin, T. 2000. A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *The Plant Cell* 12:1579-1589.
- Flaishman, M., and Kolattukudy, P. 1994. Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Plant Biology* 91:6579-6583.
- Freeman, S., Katan, T., and Shabi, E. 1995. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity test. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1014-1020.
- Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., and Shabi, E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Biochemistry and Cell Biology* 90:608-614.
- Gabor, B.K., Guillemet, F.B., and Coffey, M.D. 1990. Comparison of field resistance to *Phytophthora cinnamomi* in twelve avocado rootstocks. *Hortscience* 25:1655-1659.
- Hahn, M., and Mendgen, K. 2001. Signal and nutrient

- exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. *Plant Biology* 4:322-327.
- Hazen, K.C., and Hazen, B.W. 1992. Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 60:1499-1508.
- Hwang, C.S., Flaishman, M.A., and Kolattukudy, P.E. 1995. Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *The Plant Cell* 7:183-193.
- Jeffries, P., Dodd, J.C., Jeger, M.J., and Plumbley, R.A. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology* 39:343-366.
- Kim, Y.K., Kawano, T., Li, D., and Kolattukudy, P.E. 1998. Induction of Ca²⁺-Calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *Journal of Bacteriology* 180:5144-5150.
- Kim, Y.K., Kawano, T., Li, D., and Kolattukudy, P.E. 2000a. Mitogen-activated protein kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *The Plant Cell* 12:1331-1343.
- Kim, Y.K., Kawano, T., Li, D., and Kolattukudy, P.E. 2000b. Two novel genes induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia. *Journal of Bacteriology* 182:4688-4695.
- Latunde-Dada, A.O. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 4:187-198.
- Liu, M., and Kolattukudy, P., 1999. Early Expression of the Calmodulin gene, which precedes appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, is inhibited by self-inhibitors and requires surface attachment. *Journal of Bacteriology* 181:3571-3577.
- Marroquín-Pimentel, F.J. 1999. Factores que favorecen la incidencia de roña (*Sphaceloma perseae* Jenk.) en el cultivo de aguacate (*Persea americana* Mill.) "Hass" en tres regiones agroclimáticas de Michoacán, México. *Revista Chapingo serie Horticultura* 5:309-312.
- Mendgen, K., and Hahn, M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* 7:352-356.
- Mercia, S.G. 1999. Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango. Tesis de Doctorado. Universidad de Pretoria. Pretoria, Sudáfrica. 200 p.
- Morales, G.J.L. y Ángel, P.M. E. 2007. Hongos Fitopatógenos de Importancia Agrícola. Editorial Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán, México. 265 p.
- Morrissey, J.P., and Osbourn, A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:708-724.
- Munaut, F., Hamaide, N., and Maraitte, H. 2002. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. *Mycological Research* 106:579-593.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2007. *Colletotrichum gloeosporioides*, TaxBrowser. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Fecha de consulta: Marzo 4, 2007.
- O'Connell, R.J., Pain, N.A., Hutchison, K.A., Jones, G.L., and Green, J.R. 1996. Ultrastructure and composition of the cell surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Microscopy* 181:204-212.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). FAOSTAT-Agriculture. 2008. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Fecha de consulta: diciembre 4, 2008.
- Podila, G.K., Rogers, L.M., and Kolattukudy, P.E. 1993. Chemical signal from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology* 103:267-272.
- Prusky, D., Wattad, C., and Kobiler, I. 1996. Effect of ethylene on activation of lesion development from quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado fruits. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9:864-868.
- Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M. 2000. *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 393 p.
- Prusky, D., McEvoy, J., Leverentz, R., and Conway, W. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Phytopathology* 91:1105-1113.
- Roca, M.M.G., Ongarelli, M.G., Davide, L.C., and Mendes, C.M.C. 2000. Ultrastructural aspects in perithecia hyphae septal pores of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. *Brazilian Journal of Microbiology* 31:223-225.
- Ruiz-Herrera, J. 1993. Dimorphism in *Mucor* species. pp. 257-265. In: B.H. Vanden, F.C. Odds, and D. Kerridge (eds.). *Dimorphic Fungi in Biology and Medicine*. Springer. New York, USA. 440 p.
- Ruiz, P.E. 2001. Histopatología de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Edo. de México. 78 p.
- Salvador, L., Miranda, S.P., Aragón, N. y Lara, V. 1999. Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México* 43:18-23.
- Slade, S.J., Harris, R.F., Smith, C.S., Andrews, J.H., and Nordheim, E.V. 1987. Microplate assay for *Colletotrichum* spore production. *Applied and Environmental Microbiology* 53:627-632.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Reportes Agrícolas de Aguacate. 2007. Disponible en: <http://reporte.siap.gob.mx/>

- Agricola_siap/ResumenProducto.do. Fecha de consulta: diciembre 14 de 2008.
- Sreenivasaprasad, S., and Talhinhos, P. 2005. Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of host. *Molecular Plant Pathology* 6:361-378.
- Sexton, A.C., and Howlett, B.J. 2006. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal host. *Eukaryotic Cell* 5:1941-1949.
- Stephenson, S.A., Hatfield, J., Maclean, D.J., and Manners, J. 2000. CgDN3: An essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Plant Pathology* 13:929-941.
- Sutton, B.C. 1980. The coelomycetes: the fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and estromata. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, England. 661 p.
- Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. pp. 1-26. In: J. A. Bailey, and M.J. Jeger (eds.). *Colletotrichum*, Biology, Pathology and Control. CAB International. Wallingford, Connecticut, USA. 402 p.
- Talhinhos, P., Sreenivasaprasad, S., Neves, J., and Oliveira, H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* 71:2987-2998.
- Téliz, D. y Mora, A. 2007. El Aguacate y su Manejo Integrado. Segunda Edición. Grupo Mundi-Prensa. México, D.F. 321 p.
- Ureña, P.A.R., MacKenzie, S.J., Bowen, B.W., and Legard, D.E. 2002. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. *Phytopathology* 92:1245-1252.
- Villanueva-Arce, R., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Anguiano, M. y Téliz-Ortíz, D. 2004. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. *Agrociencia* 40:773-782.
- Wattad, D., Dinooor, A., and Prusky, D. 1994. Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:293-297.
- Wharton, P., and Diéguez, J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61:3-22.
- Wei, Y., Shih, J., Li, J., and Goodwin, P. 2002. Two pectin lyase genes, *phl-1* and *pnl-2*, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*. *Microbiology* 148:2149-2157.
- Wei, Y., Shen, W., Dauk, M., Wang, F., Selvaraj, G., and Zou, J. 2004. Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient from host plant to fungal pathogen. *The Journal of Biological Chemistry* 279:429-435.
- Xiao, C.L., MacKenzie, S.J., and Legard, D.E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated host. *Phytopathology* 94:446-453.
- Yakoby, N., Kobiler, I., Dinooor, A., and Prusky, D. 2000. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1026-1030.
- Yakoby, N., Zhou, R., Kobiler, I., Dinooor, A., and Prusky, D. 2001a. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* restriction enzyme-mediated integration mutant as biocontrol agents against anthracnose disease in avocado fruits. *Phytopathology* 91:143-148.
- Yakoby, N., Beno, D., Keen, N., Dinooor, A., Pines, A., and Prusky, D. 2001b. *Colletotrichum gloeosporioides* *pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:988-995.
- Yakoby, N., Beno, D., Kobiler, I., and Prusky, D. 2002. The analysis of fruit protection mechanism provided by reduced-pathogenicity mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* obtained by restriction enzyme mediated integration. *Phytopathology* 92:1196-1201.
- Zamora, M.T., Cárdenas, S.E., Cajuste, B.J.F. y Colinas, L.M.T. 2001. Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en frutos de aguacate "Hass". *Agrociencia* 35:237-244.