

Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of litchi fruit (*Litchi chinensis* Soon.) in Oaxaca, México

Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del fruto de litchi (*Litchi chinensis* Soon.) en Oaxaca, México

Misael Martínez Bolaños*, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Rosario Izapa. Km. 18 carretera Tapachula-Cacahoatán, Tuxtla chico, Chiapas; Daniel Téliz Ortiz, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, CP 56230, México; Antonio Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, CP 56230, México; Guadalupe Valdovinos Ponce, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, CP 56230, México; Daniel Nieto Ángel, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 carretera México-Textcoco, Montecillo, Textcoco, CP 56230, México; Eliseo García Pérez, Colegio de Postgraduados, km. 88.5 carretera Xalapa-Veracruz, CP 91690 Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Mexico; Vladimir Sánchez López, Universidad del Papaloapan. Campus Tuxtepec. Circuito Central # 200. Colonia Parque Industrial. CP 68301, Tuxtepec, México. *Autor de correspondencia: misael1480@hotmail.com

Recibido: Noviembre 20, 2014.

Aceptado: Junio 28, 2015.

Martínez-Bolaños M, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Valdovinos-Ponce G, Nieto-Ángel D, García-Pérez E y Sánchez-López V. 2015. Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Litchi Fruit (*Litchi chinensis* Soon.) in Oaxaca, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 140-155.

Abstract. Anthracnose of litchi fruits was characterized by internal and external brown circular lesions with well-defined margins on the pericarp, but not on the aril or seed. *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., and *Lasiodiplodia* sp. were isolated from symptomatic fruit pericarp samples of cultivars Mauritius and Brewster in 2008-2010 cycles. *Colletotrichum* sp. (51 %) and *Pestalotiopsis* sp. (17 %) were isolated more frequently from symptomatic fruit pericarp samples of cultivar Mauritius in 2009. *Colletotrichum* sp. was isolated on PDA (39 %) and in semi-selective medium (59 %) from symptomatic Mauritius fruit pericarp samples in 2010, and from asymptomatic pericarp Brewster samples in 2009

Resumen. La antracnosis de frutos de litchi se caracterizó como lesiones internas y externas, oscuras, circulares con márgenes definidos en el pericarpio, pero no en el arilo y semilla. *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., y *Lasiodiplodia* sp., se aislaron de muestras de pericarpio sintomático de los cultivares Mauritius y Brewster en los ciclos 2008-2010. *Colletotrichum* sp. (51 %) y *Pestalotiopsis* sp. (17 %) se aislaron más frecuentemente de muestras de pericarpio de frutos sintomáticos del cultivar Mauritius en 2009. *Colletotrichum* sp., se aisló en PDA (39 %) y en medio semiselectivo (59 %) de muestras de pericarpio sintomático en el cultivar Mauritius en 2010, y de pericarpio asintomático del cultivar en 2009 (32 %) y 2010 (21 %) sobre PDA y 10% en medio semiselectivo; sin embargo no se aisló de pericarpio asintomático del cultivar Mauritius en ninguno de los dos años de cosecha.

Sólo *Colletotrichum* sp., reprodujo la enfermedad en laboratorio (17 de 20 frutos inoculados) y

(32 %) and 2010 (21 %) on PDA and 10 % in semi-selective medium; however it was not isolated from asymptomatic Mauritius pericarp in neither of the two harvesting years. Only *Colletotrichum* sp., reproduced the disease in the laboratory (17 out of 20 inoculated fruits) and in the field (19 out of 20 inoculated fruits). The fungus was morphologically and molecularly identified as *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Keywords: Brewster, incidence, Mauritius, pathogenicity, PCR, pericarp.

INTRODUCTION

Litchi (*Litchi chinensis* Soon) is a subtropical fruit (Coates *et al.*, 1994) native to southern China and southeast Asia; its pericarp is thin and rough, and when fruits get ripe, it becomes red and cracked due to the presence of brachysclereids, which could be associated with protection against mechanical damage or physiological stress (Nacif *et al.*, 2001). The aril is white and covers a dark brown seed.

The main problems in litchi production are low or irregular yields due to excessive fruit drop (Mitra *et al.*, 2005); oxidation and cracking of the pericarp (Huang *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005); pest damages caused by *C. gloeosporioides* Penz (Campbell and Campbell, 2001), *Peronophythora litchii* Chen Ex Ko, *Tessaratomya papillosa* Drury and *Dasineura* sp., and high harvesting and packaging costs (Xu *et al.*, 2005).

Litchi production in Mexico is 19,888.05 tons, in an area of 3,738.48 hectares (SIAP, 2013). In Oaxaca, Mexico, Brewster and Mauritius cultivars are commercially grown in the Papaloapan and Bajos Mixes regions, respectively. In both cultivars, a regular dark brown spot on the pericarp represents one of the main problems under field

en campo (19 de 20 frutos inoculados). El hongo se identificó morfológica y molecularmente como *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

Palabras clave: Brewster, incidencia, Mauritius, patogenicidad, PCR, pericarpio.

INTRODUCCIÓN

El litchi (*Litchi chinensis* Soon) es un fruto subtropical (Coates *et al.*, 1994) nativo del sur de China y sureste de Asia; su pericarpio es delgado y áspero, y cuando madura es de color rojo y con coartaduras debido a la presencia de braquiesclereidas, cuya función podría estar asociada con la protección contra daños mecánicos o estrés fisiológico (Nacif *et al.*, 2001). El arilo es blanco y cubre una semilla marrón oscuro.

Los principales problemas en la producción del litchi son rendimientos bajos o irregulares debido a caída excesiva de frutos (Mitra, *et al.*, 2005); oxidación y coartadura del pericarpio (Huang *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005); daños por plagas causados por *C. gloeosporioides* Penz (Campbell y Campbell, 2001), *Peronophythora litchii* Chen Ex Ko, *Tessaratomya papillosa* Drury y *Dasineura* sp., y costos altos en cosecha y empaque (Xu *et al.*, 2005).

La producción de litchi en México es de 19,888.05 toneladas, en un área de 3,738.48 hectáreas (SIAP, 2013). En Oaxaca, México, los cultivares Brewster y Mauritius se siembran comercialmente en la región del Papaloapan y los Bajos Mixes, respectivamente. En ambos cultivares, una mancha oscura regular en el pericarpio representa uno de los principales problemas en condiciones de campo y postcosecha. Los síntomas en campo se caracterizan como lesiones semicirculares café y secas; el arilo y semilla no muestran daño. No se

and postharvest conditions. Field symptoms are characterized by brown and dry semicircular lesions; the aril and seed show no damages. No records have been found about its cause and importance in Mexico so far; however, Oaxaca farmers report damages of up to 50% in production. Taking in to account the socioeconomic importance of this problem, the objective of this study was to determine the etiology of the brown spot of litchi fruits in Oaxaca, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was established in commercial litchi orchards in three counties of Oaxaca State during the 2008-2010 production cycles. Brewster and Mauritius cultivars were evaluated in San Jose Chiltepec (17° 57' 57.92" N, 96° 10' 11.68" W), and in San Juan Cotzocón (17° 26' 07.74" N, 95° 19' 53.97" W) and Loma Bonita (17° 58' 53.1" N, 95° 50' 58.1" W), respectively.

Symptoms and fungi characterization. Symptomatic (natural infection) and asymptomatic commercial ripe fruits from Brewster and Mauritius cultivars were collected in May 2009 in one commercial litchi orchard in San José Chiltepec and San Juan Cotzocón, respectively. One hundred fruits from each cultivar were randomly collected from 25 trees and then, washed with soap and water in the laboratory, air dried at room temperature, and longitudinally sectioned. Symptom consistency, shape, and color were evaluated on pericarp, aril, seed, and peduncle, as well as the presence of chlorotic haloes and signs of associated microorganisms.

To characterize fungal isolates, 123 symptomatic and 195 asymptomatic Brewster fruits were harvested in 2008-2009, and 60 and 70 in 2009-2010. Then, 193 symptomatic and 72 asymptomatic

han encontrado registros de su causa o importancia en México hasta ahora; sin embargo, productores de Oaxaca reportan daños superiores a 50% en producción. Por la importancia socioeconómica de este problema, el objetivo de este estudio fue determinar la etiología del manchado café en frutos de litchi en Oaxaca, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en huertos comerciales de litchi en tres municipios de Oaxaca, México durante los ciclos de producción 2008-2010. Los cultivares Brewster y Mauritius se evaluaron en San José Chiltepec (17° 57' 57.92" N y 96° 10' 11.68" O), y en San Juan Cotzocón (17° 26' 07.74" N y 95° 19' 53.97" O) y Loma Bonita (17° 58' 53.1" N y 95° 50' 58.1" O), respectivamente.

Síntomas y caracterización de hongos. Los frutos sintomáticos (infección natural) y asintomáticos de los cultivares Brewster y Mauritius en madurez comercial, se colectaron en mayo de 2009 de una parcela comercial de litchi en San José Chiltepec y San Juan Cotzocón, respectivamente. Cien frutos de cada cultivar se colectaron de manera aleatoria a partir de 25 árboles, posteriormente se lavaron con jabón y agua en laboratorio, se secaron a temperatura ambiente y se seccionaron longitudinalmente. En el pericarpio, arilo, semilla y pedúnculo se evaluó la consistencia del síntoma, su forma y color, así como la presencia de halo clorótico y signos de microorganismos asociados.

Para la caracterización de hongos aislados, se cosecharon 123 frutos sintomáticos y 195 asintomáticos del cultivar Brewster en el ciclo 2008-2009, y 60 y 70 en 2009-2010. Además, se muestrearon 193 frutos sintomáticos y 72 asintomáticos del cultivar Mauritius en el ciclo 2008-2009, y 102 y 96 en 2009-2010.

Mauritius fruits were sampled in 2008-2009, and 102 and 96 in 2009-2010. Two 1.5 cm² sections of pericarp and aril were dissected from each fruit and disinfested in 1.5 % sodium hypochlorite for three min, rinsed three times in distilled water for 1 min each, and dried with sterile paper towels. Tissue sections were cultured on PDA (Bioxon™) and on a *Colletotrichum* semi-selective medium [19.5 g PDA, 7.5 g agar (Merck™), 8 mg iprodione, 20 mg triadimefon, 50 mg chloramphenicol (Merck™), and 200 mg streptomycin] (Davis, 2003) for 5-7 days at 25 °C under fluorescent light. Fungal growths were purified by hyphal tip and monoconidial cultures.

Pathogenicity tests. *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, and *Lasiodiplodia* were isolated from all the Brewster and Mauritius pericarp symptomatic samples and their pathogenicity was tested under laboratory and field conditions.

Laboratory pathogenicity test was evaluated in asymptomatic and commercially ripe Mauritius fruit collected in field in May 2010. Twenty disinfested fruits were wounded with a sterile needle and a 0.5 cm agar disc with *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, or *Lasiodiplodia* was placed on each wound (Johnson and Cooke, 2002). Control fruits (mockinoculated) were inoculated with a 0.5 cm agar disc without mycelia. All inoculated fruits were maintained under humidity chamber conditions at 28 °C±2 for 7 days. Observations were done every 24 h to detect symptoms.

Pathogenicity under field conditions was evaluated in May and June 2010 on 20 asymptomatic Mauritius fruits per tree (5 fruits/cardinal point). Two development stages were evaluated: at the beginning of ripening, and commercially ripe fruits. Fruits were disinfested with 70 % ethanol and wounded with a sterile needle in the middle of the fruit and at the base of the peduncle. Fruits were

Dos secciones de pericarpio y arilo de 1.5 cm² se cortaron de cada fruto y se desinfectaron en hipoclorito de sodio por tres minutos, se enjuagaron tres veces en agua destilada por un minuto cada uno, y se secaron en papel estéril. Las porciones de tejido se incubaron en PDA (Bioxon™) y en un medio semi-selectivo a *Colletotrichum* [19.5 g PDA, 7.5 g agar (Merck™), 8 mg iprodione, 20 mg triadimefón, 50 mg chloramphenicol (Merck™), y 200 mg estreptomycin] (Davis, 2003) durante 5-7 días a 25° C bajo luz fluorescente. Los crecimientos de hongos se purificaron por punta de hifa y cultivos monoconidiales.

Pruebas de patogenicidad. *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, y *Lasiodiplodia* se aislaron de todas las muestras de pericarpio sintomáticas de los cultivares Brewster y Mauritius y se patogenicidad fue evaluada en condiciones de laboratorio y campo.

Las pruebas de patogenicidad en laboratorio se evaluaron en frutos asintomáticos y en madurez comercial del cultivar Mauritius colectados en campo en mayo de 2010. Veinte frutos desinfectados fueron heridos con una aguja estéril y en cada herida se les colocó un disco de 0.5 cm de agar con *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, o *Lasiodiplodia* (Johnson y Cooke, 2002). Los frutos de control (testigos) fueron inoculados con un disco de agar de 0.5 cm sin micelio. Todos los frutos inoculados se mantuvieron en condiciones de cámara húmeda a 28 °C ±2 por 7 días. Las observaciones se realizaron cada 24 h para detectar síntomas.

La patogenicidad en campo se evaluó en mayo y junio de 2010 en 20 frutos asintomáticos por árbol del cultivar Mauritius (5 frutos/punto cardinal). Dos etapas de desarrollo se evaluaron: frutos en el inicio de maduración, y en madurez comercial. Los frutos se desinfectaron con etanol 70 % y heridos con aguja estéril en la mitad del fruto y en la

individually inoculated at evening (18:00 – 20:00 central time) by injecting 0.5 ml of a 1×10^6 conidia. ml⁻¹ suspension of *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* or sterile distilled water (mockinoculated) (Dinh *et al.*, 2003). Inoculated wounds were covered with wet sterile cotton for 24 h to create high humidity conditions for fungal growth. Symptom development was registered for 15 days. Re-isolates from laboratory and field infected fruits were made to verify Koch's postulates.

Morphological characterization of the pathogen. Four out of 256 *Colletotrichum* isolates obtained from symptomatic fruits were selected based on their mycelia growth and spore production, and designed as M26, M28, M29, and M30. Genus (Sutton, 1980; Hanlin, 1990; Barnett and Hunter, 2006) and species (Sutton, 1980; Smith and Black, 1990; Photita *et al.*, 2005) were determined from monoconidial colonies. Appressorium formation was induced on PDA cover slides inoculated individually with M26 and M28-M30 spores (Johnston and Jones, 1997). Appressorium shape and size were characterized a 7 day old fungal culture on PDA.

M26 and M28-M30 growth rates were evaluated for seven days on PDA plates cultured at 28 °C. Data were statistically analyzed by ANOVA ($\alpha=0.05$) and grouped by Tukey test (SAS, 1997).

Molecular identification. M26 and M28-M30 DNA was isolated following the AP method (Sambrook and Russel, 2001). DNA integrity was electrophoresed on a 1% agar gel at 80 volts for 40 min in TBE buffer, and stained with ethidium bromide. ITS1 and ITS2 regions were amplified by PCR with primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990), which amplify a 580 bp

base del pedúnculo. Los frutos fueron inoculados individualmente por la noche (18:00 – 20:00 hora del centro) mediante deposición de 0.5 ml de una suspensión 1×10^6 conidios.ml⁻¹ de *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia* o agua destilada estéril (testigo) (Dinh *et al.*, 2003). Los puntos de inoculación se cubrieron con algodón estéril húmedo por 24 h para crear condiciones de alta humedad para el crecimiento de los hongos. El desarrollo de los síntomas se registró por 15 días. Los reaislamientos de los frutos infectados en laboratorio y campo se realizaron para verificar los postulados de Koch.

Caracterización morfológica del patógeno. Cuatro de 256 aislamientos de *Colletotrichum* obtenidos de frutos sintomáticos fueron seleccionados con base a su crecimiento miceliar y producción de esporas, e identificados como M26, M28, M29, y M30. El género (Sutton, 1980; Hanlin, 1990; Barnett y Hunter, 2006) y especies (Sutton, 1980; Smith y Black, 1990; Photita *et al.*, 2005) se determinó a través de colonias monoconidiales. La formación de apresorios se indujo en PDA depositado en un portaobjeto e inoculado individualmente con esporas del M26 y M28-M30 (Johnston y Jones, 1997). La forma y tamaño de los apresorios se caracterizó a partir de colonias de hongos de 7 días de edad crecidas en PDA.

Las tasas de crecimiento de M26 y M28-M30 se evaluaron por siete días en placas de PDA incubadas a 28 °C. Los datos se analizaron estadísticamente por ANOVA ($\alpha=0.05$) y agrupadas por pruebas de Tukey (SAS, 1997).

Identificación molecular. M26 y M28-M30 fueron aislados mediante el método AP (Sambrook y Russel, 2001). La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agar 1 % a 80 volts por 40 min en Buffer TBE, y teñido con bromuro de etidio.

fragment. To identify and confirm species, DNA was amplified with ITS4 and the CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') specific primer (Mills *et al.*, 1992), which amplify a 450 bp fragment.

PCR amplification was done in a thermocycler (Applied Biosystems™ 2720) in a 25 µl reaction with 1.0 µl of each primer (10 mM), 1.0 µl of dNTP (10 mM), 5 µl of PCR Buffer 10X, 2.5 µl of MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl of Taq Polymerase, 0.5 µl of DNA and 13.5 µl of nuclease-free water. PCR reactions without tempered were used as negative control.

PCR consisted of an initial denaturation of 5 min at 95 °C followed by 35 cycles of 1 min of denaturation at 95 °C, 1 min of annealing at 57 °C, and 1 min of extension at 72 °C, with a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were electrophoresed on a 1 % agarose gel, purified with the QUIAGEN DNeasy Plant Kit and sequenced in a 3730XL automated sequencer. The sequences were lined up against sequences in the gene bank and homology was determined in the National Center for Biological Information (BLAST, 2011).

RESULTS

Symptom characterization. The Brewster exocarp showed a dark brown lesion without chlorotic halo (Figure 1A). On the endocarp, the lesion was a dark brown circular, and semi-humid depressed spot without chlorotic halo (Figure 1B). On Mauritius exocarp it developed a dark brown well defined lesion with chlorotic halo (Figure 1D); and on the endocarp a dry dark brown non-depressed spot was identified (Figure 1E). None of the Brewster and Mauritius fruits showed damages on the aril (Figure 1C and 1F), seed, or peduncle, and no signs of microorganisms were observed.

Fungi isolation. *Colletotrichum* sp., *Pestalotiop-*

Las regiones ITS1 e ITS2 se amplificaron por PCR con los iniciadores ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAG-TAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.*, 1990), los cuales amplificaron un fragmento de 580 pb. Para identificar y confirmar especies, el ADN se amplificó con ITS4 y el iniciador específico CgInt (5'-GGCCTCCCGCCTCCGGGCGG-3') (Mills *et al.*, 1992), los cuales amplificaron un fragmento de 450 pb.

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador (Applied Biosystems™ 2720) en una reacción de 25 µl con 1.0 µl de cada iniciador (10 nM), 1.0 µl de dNTP (10 nM), 5 µl de Buffer PCR 10X, 2.5 µl de MgCl₂ (50 nM), 0.5 µl de Taq Polimerasa, 0.5 µl de ADN y 13.5 µl de agua libre de nucleasas. Las reacciones PCR sin templado se utilizaron como control negativo.

La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C seguido de 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de alineamiento a 57 °C, y 1 min de extensión a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos PCR fueron electroforesados en un gel de agarosa 1 %, purificado con el kit QUIAGEN DNeasy Plant y secuenciado en un secuenciador automático 3730XL. Las secuencias fueron alineadas contra secuencias en el banco de genes y su homología se determinó en el Centro Nacional para Información Biológica (BLAST, 2011).

RESULTADOS

Caracterización de síntomas. El exocarpo de Brewster mostró una lesión café oscura sin halo clorótico (Figura 1A). En el endocarpo, la lesión fue una mancha café oscura circular, hundida, semi-húmeda y sin halo clorótico (Figura 1B). En el exocarpo de Mauritius se desarrolló una lesión

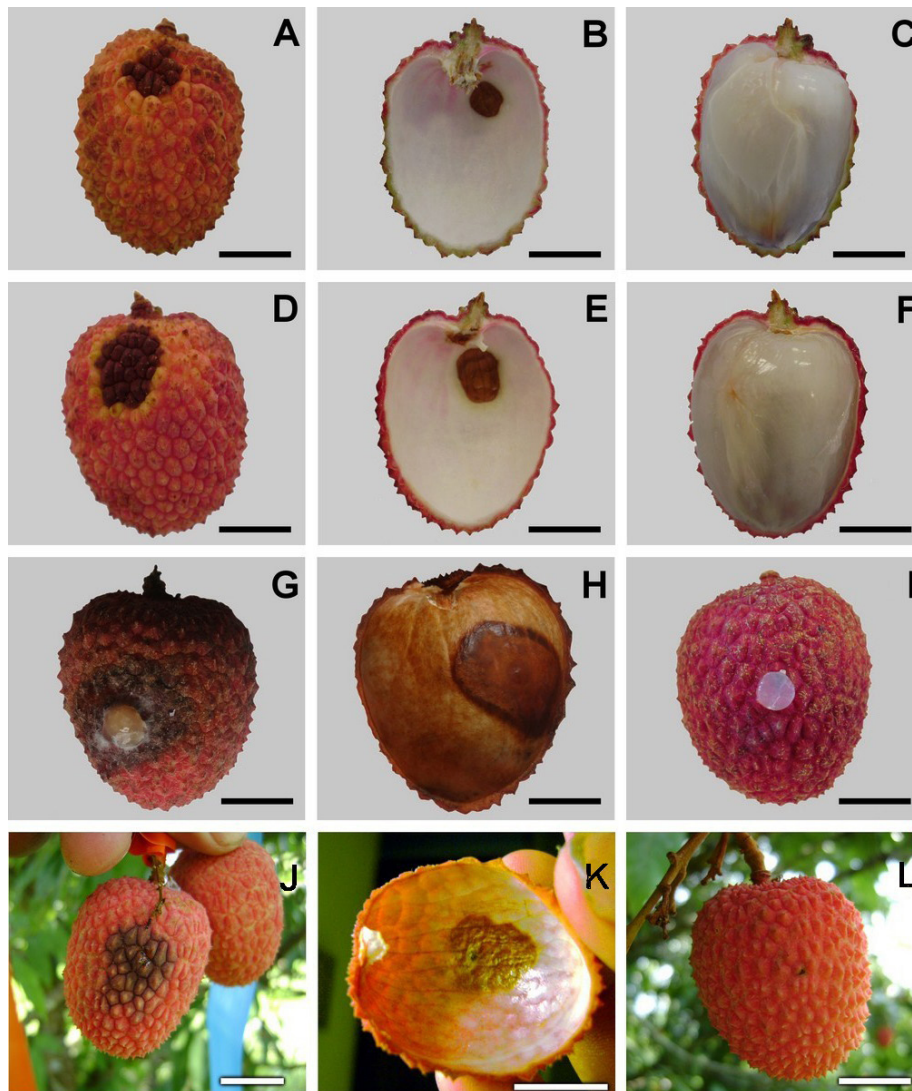


Figure 1. Litchi fruits (*Litchi chinensis* Soon) with anthracnose symptoms. Brewster cv: A) Pericarp external symptom, B) Asymptomatic aril, C) Pericarp internal symptom. Mauritius cv: D) Pericarp external symptom, E) Asymptomatic aril F) Pericarp internal symptom. Pathogenicity of *C. gloeosporioides* on Mauritius litchi fruits in the laboratory: G) Control fruits, H) Pericarp external symptom, I) Pericarp internal symptom. Pathogenicity on Mauritius litchi fruits in the field: J) Control fruits, K) Pericarp external symptom, L) Pericarp internal symptom. Bar = 1 cm.

Figura 1. Frutos de litchi (*Litchi chinensis* Soon) con síntomas de antracnosis. Cultivar Brewster: A) Síntoma externo en pericarpio, B) Arilo asintomático, C) Síntoma interno de pericarpio. Cultivar Mauritius: D) Síntoma externo en pericarpio, E) Arilo asintomático F) Síntoma interno de pericarpio. Patogenicidad de *C. gloeosporioides* en frutos de litchi en laboratorio: G) Frutos de control, H) Síntoma externo de pericarpio, I) Síntoma interno de pericarpio. Patogenicidad en frutos de litchi Mauritius en campo: J) Frutos control, K) Síntoma externo de pericarpio, L) Síntoma interno de pericarpio. Bar = 1 cm.

sis sp., *Fusarium* sp., and *Lasiodiplodia* sp. were isolated from symptomatic Brewster and Mauritius pericarps in the 2008-2009 and 2009-2010 produc-

café obscura bien definida con halo clorótico (Figura 1D); y en el endocarpo se observó una mancha café obscura no húmeda, no hundida (Figura 1E).

tion cycles. However, *Colletotrichum* sp. (256/640 isolates) and *Pestalotiopsis* sp. (71/640 isolates) were isolated more frequently than the other ones (Table 1 and 2). *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., and *Lasiodiplodia* sp. were also isolated from Brewster asymptomatic pericarps (Table 1); and *Fusarium* from asymptomatic Mauritius samples (Table 2). *Colletotrichum* sp. grew on more pericarp tissue fragments incubated on semi-selective medium than those cultured on PDA (Table 1 and 2). *Colletotrichum* sp. isolates produced conidia on 4 and on 8-12 day old semi-selective and PDA cultures, respectively. No microorganisms were isolated from aril tissue fragments incubated on both growth media (Table 1 and 2).

In 13 of 15 sections of pericarp incubated in

En ninguno de los frutos de Brewster y Mauritius se observó daños en el arilo (Figura 1C y 1F), semilla, o pedúnculo, y no se observaron signos de microorganismos.

Aislamiento de hongos. *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Fusarium* sp., y *Lasiodiplodia* sp., se aislaron de pericarpios sintomáticos de Brewster y Mauritius en los ciclos de producción 2008-2009 y 2009-2010. Sin embargo, *Colletotrichum* sp. (256/640 aislamientos) y *Pestalotiopsis* sp. (71/640 aislamientos) fueron aislados más frecuentemente que los otros (Cuadro 1 y 2). *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., y *Lasiodiplodia* sp., fueron también aislados de pericarpios asintomáticos de Brewster (Cuadro 1); y *Fusarium* de muestras

Table 1. Fungal genera isolates from symptomatic and asymptomatic litchi fruits (Brewster cultivar), in San Jose Chiltepec, Oaxaca.
Cuadro 1. Géneros de hongos aislados de frutos de litchi sintomáticos y asintomáticos (cultivar Brewster), en San José Chiltepec, Oaxaca

Production cycle	Tissue/symptoms	Growth medium	Fungal genera (% proportion)
2008-2009	Pericarp-Anthracnose	PDA	<i>Colletotrichum</i> 26 % (32/123) <i>Pestalotiopsis</i> 15 % (18/123) <i>Fusarium</i> 2 % (3/123)
	Aril-Anthracnose Pericarp-Asymptomatic	PDA PDA	0 % (0/123) <i>Colletotrichum</i> 32 % (62/195) <i>Lasiodiplodia</i> 10 % (19/195) <i>Pestalotiopsis</i> 1 % (2/195)
2009-2010	Aril- Asymptomatic	PDA	0 % (0/195)
	Pericarp-Anthracnose	PDA	<i>Pestalotiopsis</i> 16 % (10/60)
		Semi-selective	<i>Colletotrichum</i> 6 % (4/60) <i>Colletotrichum</i> 30 % (18/60) <i>Lasiodiplodia</i> 15 % (9/60) <i>Pestalotiopsis</i> 5 % (3/60) <i>Fusarium</i> 2 % (1/60)
	Aril-Anthracnose	PDA	0 % (0/60)
	Pericarp-Asymptomatic	Semi-selective	0 % (0/60)
		PDA	<i>Colletotrichum</i> 21 % (15/70) <i>Pestalotiopsis</i> 11 % (8/70) <i>Lasiodiplodia</i> 1 % (1/70)
Aril- Asymptomatic	Semi-selective	<i>Colletotrichum</i> 10 % (7/70) <i>Pestalotiopsis</i> 1 % (1/70)	
	PDA	0 % (0/70)	
		Semi-selective	0 % (0/70)

Table 2. Fungal genera isolates from symptomatic and asymptomatic litchi fruits (Mauritius cultivar), in San Juan Cotzocón, Oaxaca.
Cuadro 2. Géneros de hongos aislados de frutos de litchi sintomáticos y asintomáticos (cultivar Mauritius), en San Juan Cotzocón, Oaxaca

Production cycle	Tissue	Growth medium	Fungal genera (% proportion)
2008-2009	Pericarp-Anthracnose	PDA	<i>Colletotrichum</i> 51 % (99/193) <i>Pestalotiopsis</i> 17 % (33/193) <i>Fusarium</i> 5 % (10/193) <i>Lasiodiplodia</i> 4 % (7/193)
		PDA	0 % (0/193)
		PDA	<i>Fusarium</i> 5 % (4/72)
2009-2010	Pericarp-Asymptomatic	PDA	0 % (0/72)
		PDA	<i>Colletotrichum</i> 39 % (40/102) <i>Lasiodiplodia</i> 9 % (9/102) <i>Pestalotiopsis</i> 3 % (3/102) <i>Fusarium</i> 1 % (1/102)
		PDA	<i>Colletotrichum</i> 62 % (63/102) <i>Lasiodiplodia</i> 9 % (9/102) <i>Pestalotiopsis</i> 4 % (4/102)
	Aril-Anthracnose	PDA	0 % (0/102)
		Semi-selective	0 % (0/102)
		PDA	<i>Fusarium</i> 4 % (4/96) <i>Lasiodiplodia</i> 21 % (20/96) <i>Pestalotiopsis</i> 10% (10/96)
	Pericarp-Asymptomatic	Semi-selective	0 % (0/96)
		PDA	0 % (0/96)
		Semi-selective	0 % (0/96)

humidity chamber there was conidia production on the fifth day; the salmon colored conidia masses were morphologically identified as *Colletotrichum* sp.

Pathogenicity tests. Laboratory test results showed that 85 % (17 out of 20) of the fruits inoculated with *Colletotrichum* sp. developed symptoms on the pericarp similar to those observed in the field. These symptoms appeared 72 h after inoculation as a small light brown circular lesion (Figure 1G). On the endocarp it was developed a dark brown circular and semi-humid lesion (Figure 1H). Mock inoculated fruits (Figure 1I) and fruits inoculated with *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., or *Lasiodiplodia* sp. did not show any symptom.

In the field, symptoms developed in 95 % (19

asintomáticas de Mauritius (Cuadro 2). *Colletotrichum* sp., creció más en los fragmentos de tejido de pericarpio incubados en medio semi-selectivo que los incubados en PDA (Cuadro 1 y 2). Los aislamientos de *Colletotrichum* sp., produjeron conidios en medio semi-selectivo y PDA de 4 y 8-12 días de edad, respectivamente. Ningún microorganismo fue aislado de fragmentos de tejidos de arilo incubados en ambos medios de cultivo (Cuadro 1 y 2). En 13 de 15 fragmentos de pericarpio incubados en cámara húmeda existió producción de conidios al quinto día; las masas de conidios de color salmón se identificaron morfológicamente como *Colletotrichum* sp.

Pruebas de patogenicidad. Los resultados en pruebas de laboratorio mostraron que 85 % (17 de

out of 20) of the commercial ripe Mauritius fruits inoculated with *Colletotrichum* sp. on the middle of the pericarp in May, and 90 % in June. Symptoms were observed eight days after inoculation as dark brown lesions on the pericarp (Figure 1J). Symptom on the endocarp was a dark brown circular and depressed lesion (Figure 1K).

Mock inoculated fruits (Figure 1L) and fruits inoculated with *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., or *Lasiodiplodia* sp. did not show any symptoms.

The *Colletotrichum* isolate that induced anthracnose symptoms under laboratory and field conditions was re-isolated and identified morphologically as *C. gloeosporioides* (Sutton, 1980).

Pathogen characterization and identification.

Most (193) of the 256 isolates of *C. gloeosporioides* formed white-light gray scarcely cottony mycelia with abundant bright orange conidial masses in concentric circles (Figure 2A, 2D and 2G). Some (78) of them produced white mycelium with very few conidial masses near to the transference point (Figure 2J). Four out of these 256 isolates were designed as M26, M28, M29 and M30.

M26 and M28-M30 conidia were cylindrical (Table 3 and Figure 2B, 2E, 2H and 2K). M26 conidia were statistically longer than M28 ones, which had the greatest diameter (Table 3). The four isolates formed clavate appressoria (Figure 2C, 2F, 3I and 2L). There were not differences among the mycelium growth rates of the four isolates cultured at 28 °C on PDA ($\alpha= 0.05$) (Table 3).

Molecular identification. ITS4-ITS5 and ITS4-CgInt primers amplified a fragment of 580 and 450 bp, respectively, which indicated that M26 and M28-M30 isolates belong to *C. gloeosporioides* (Figure 3).

M26 and M28-M30 amplicons were sequenced

20) de los frutos inoculados con *Colletotrichum* sp., desarrollaron síntomas en el pericarpio en forma similar a los observados en campo. Estos síntomas aparecieron 72 h después de la inoculación como lesiones pequeñas circulares de color café brillante (Figura 1G). En el endocarpo se desarrolló una lesión café oscura circular y semi-húmeda (Figura 1H). Los frutos testigo (Figura 1I) y frutos inoculados con *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., o *Lasiodiplodia* sp., no mostraron ningún síntoma.

En campo, los síntomas se desarrollaron en 95% (19 de 20) de los frutos de Mauritius en madurez comercial inoculados con *Colletotrichum* sp. en la parte media del pericarpio en mayo, y 90% en junio. Los síntomas se observaron ocho días después de la inoculación como lesiones café oscuras en el pericarpio (Figura 1J). Los síntomas en el endocarpo fueron lesiones café oscuras, circulares y hundidas (Figura 1K).

Los frutos testigo (Figura 1L) y frutos inoculados con *Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp., o *Lasiodiplodia* sp., no mostraron ningún síntoma.

El aislamiento de *Colletotrichum* que indujo el síntoma de antracnosis en condiciones de laboratorio y campo fue reaislado e identificado como *C. gloeosporioides* (Sutton, 1980).

Caracterización e identificación del patógeno.

La mayoría (193) de los 256 aislamientos de *C. gloeosporioides* formaron micelio blanco-gris claro, ligeramente algodonoso, con abundantes masas de conidios naranja brillante en círculos concéntricos (Figura 2A, 2D y 2G). Algunos (78) de ellos produjeron un micelio blanco con pocas masas conidiales próximas al punto de transferencia (Figura 2J). Cuatro de estos 256 aislamientos fueron designados como M26, M28, M29 y M30.

Los conidios de M26 y M28-M30 fueron cilíndricos (Cuadro 3 y Figura 2B, 2E, 2H y 2K). Los conidios de M26 fueron estadísticamente más

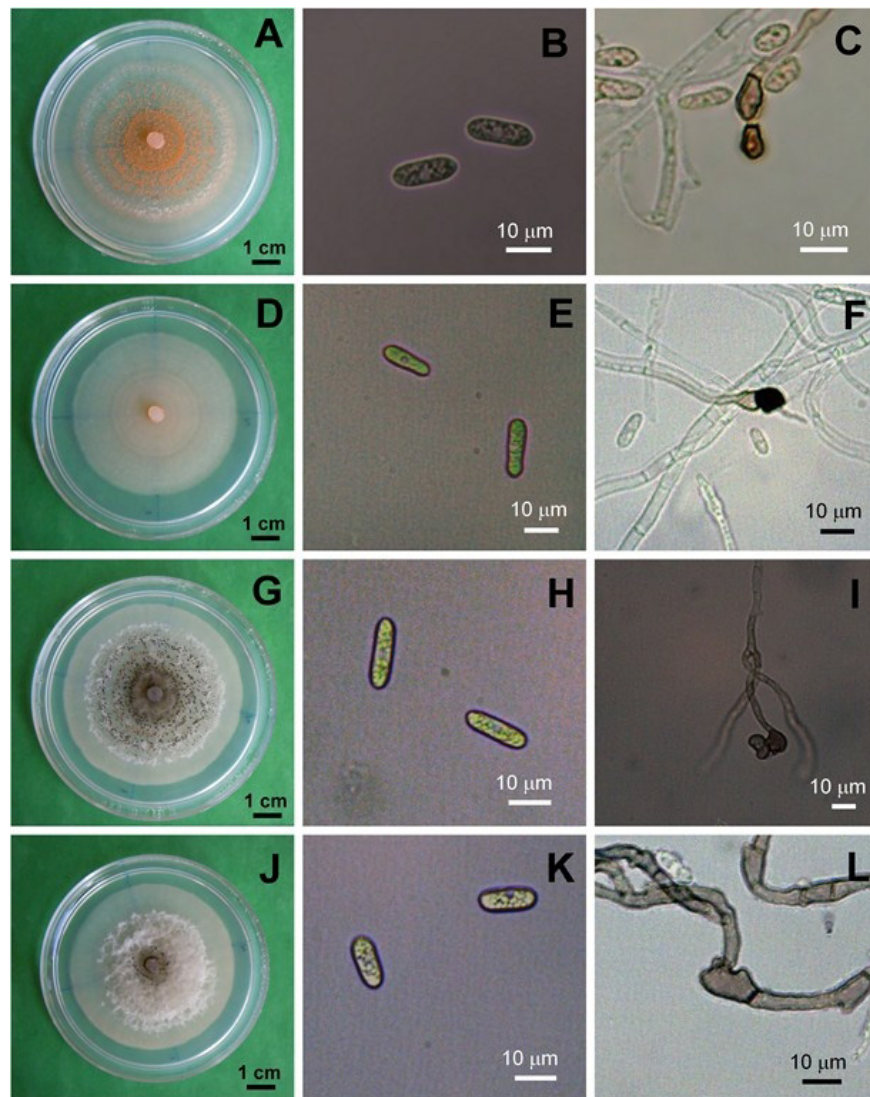


Figure 2. Colony Morphology (A,D,G, J), conidia (B, E H, K) and mycelial appressoria (C, F, I, L) of the four representative isolates M26 (A,B,C), 28 (D,E,F), 29 (G,H,I), 30 (J,K,L) of *Colletotrichum gloeosporioides* from litchi fruits, after five days in PDA.

Figura 2. Morfología colonial (A, D, G, J), conidios (B, E H, K) y apresorios miceliales (C, F, I, L) de cuatro aislamientos representativos M26 (A, B, C), 28 (D, E, F), 29 (G, H, I), 30 (J, K, L) de *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de litchi, después de cinco días en PDA.

and aligned with those in the GenBank, and gave a homology of 96, 93, 99, and 99 % with *C. gloeosporioides*, respectively (gb/HM016794.1; gb/JF487788.1; gb/JF487788.1; gb/FJ755268.1) (BLAST, 2011).

largos que los de M28, los cuales tuvieron los mayores diámetros (Cuadro 3). Los cuatro aislamientos formaron apresorios clavados (Figura 2C, 2F, 3I y 2L). No existieron diferencias entre las tasas de crecimiento micelial de los cuatro aislamientos incubados a 28 °C en PDA ($\alpha= 0.05$) (Cuadro 3).

Table 3. Conidium size and mycelium growth rate of M26 and M28-M30 *C. gloeosporioides* isolates obtained from litchi fruits with anthracnose symptoms in San Jose Chiltepec and Loma Bonita, Oaxaca (2009-2010 production cycle).

Cuadro 3. Tamaño de conidio y tasas de crecimiento micelial de los aislamientos M26 y M28-M30 de *C. gloeosporioides* obtenidos de frutos de litchi con síntomas de antracnosis en San José Chiltepec y Loma Bonita, Oaxaca (ciclo de producción 2009-2010).

Isolate	Length (µm) ^x			Diameter (µm) ^x			Mycelium growth (mm/day) ^x PDA/28 °C
	Min	Max	Aver.	Min	Max	Aver.	
M26	11.1	20.8	15.7 ^a	3.4	6.6	4.9 ^b	10.74 ^a
M28	11.4	17.2	14.4 ^b	4.2	7.1	5.6 ^a	8.41 ^a
M29	11.5	17.8	15.0 ^{ab}	3.7	5.7	4.8 ^b	9.52 ^a
M30	11.0	17.4	14.9 ^{ab}	4.0	5.8	4.7 ^b	9.34 ^a

^x Values with the same letter in each row are statistically the same, Tukey (P≤0.05) / ^x Valores con las misma letra en cada columna son estadísticamente iguales, Tukey (P≤0.05).

DISCUSSION

The results of this study indicate that *C. gloeosporioides* is the causal agent of anthracnose disease in pre-harvest litchi fruits of Brewster and

Identificación molecular. Los iniciadores ITS4-ITS5 e ITS4-CgInt amplificaron un fragmento de 580 y 450 pb, respectivamente, lo cual indicó que los aislamientos M26 y M28-M30 corresponden a *C. gloeosporioides* (Figura 3).

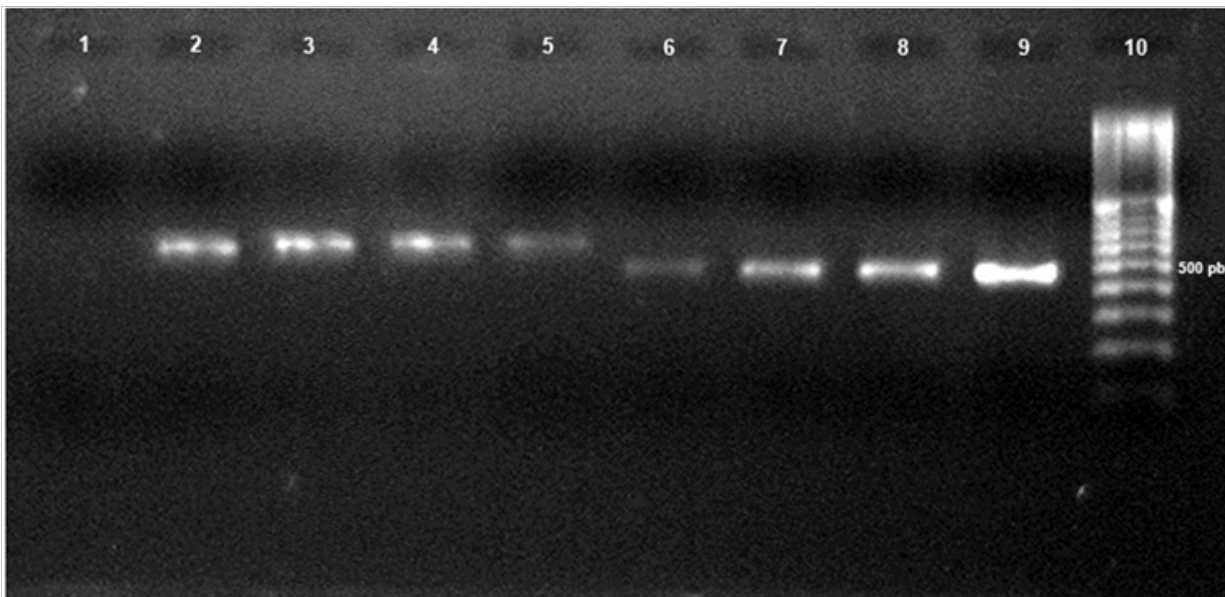


Figure 3. PCR product of four characteristic isolates (M26, M28, M29, and M30) of *Colletotrichum gloeosporioides*. Lines: 1) Control (H₂O PCR); 2) M26- ITS4/ITS5; 3) M28- ITS4/ITS5; 4) M29- ITS4/ITS5; 5) M30- ITS4/ITS5; 6) M26- ITS4-CgInt; 7) M28- ITS4-CgInt; 8) M29- ITS4-CgInt; 9) M30- ITS4-CgInt; 10) 100 base pair (bp) marker (Invitrogen).

Figura 3. Producto de PCR de cuatro aislamientos característicos (M26, M28, M29, y M30) de *Colletotrichum gloeosporioides*. Líneas: 1) Control (H₂O PCR); 2) M26- ITS4/ITS5; 3) M28- ITS4/ITS5; 4) M29- ITS4/ITS5; 5) M30- ITS4/ITS5; 6) M26- ITS4-CgInt; 7) M28- ITS4-CgInt; 8) M29- ITS4-CgInt; 9) M30- ITS4-CgInt; 10) marcador de 100 pares de bases (bp) (Invitrogen).

Mauritius cultivars in Oaxaca, Mexico. The fungus was isolated from natural and artificially infected fruits of both cultivars, and formed a cottony white to light gray mycelial growth with salmon colored conidial masses on PDA. Symptoms on inoculated fruits were very similar to those observed in field with natural infection.

In this research, *Colletotrichum* was also isolated from asymptomatic Brewster fruits; similar results were reported by Ann *et al.*, (2004), who isolated *C. gloeosporioides* from asymptomatic flowers and immature fruits of the *Black leaf* litchi cultivar. Once fruits were harvested and stored, they developed anthracnose symptoms, suggesting that this pathogen attacks litchi through latent infections. We consider the probable endophytic nature of *C. gloeosporioides* in the field.

As mentioned before, litchi anthracnose has been consigned mainly as a postharvest disease (Coates *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2003, and Liu *et al.*, 2006) that results from quiescent infections (Li *et al.*, 2005); however, this fungus has been reported as the causal agent of the peduncle rot and *pepper spotting* on litchi fruits under field conditions in Australia (Cooke *et al.*, 2009). Others causes of pericarp browning at postharvest are moisture loss due to desiccation of the pericarp (Chen and Hong, 1992; Underhill and Critchley, 1993), degradation of anthocyanins and oxidation of phenolic substrates by polyphenol oxydase (Underhill and Critchley, 1993) and/or peroxidase enzymes (Zhang and Quantick, 1997).

Species of *Colletotrichum* cannot be recognized by host range (Sutton, 1980, 1992), so identification and characterization of the isolates obtained in this study were done based on morphological characteristics (Smith and Black, 1990; Gunnell and Gubler, 1992; Sutton, 1992). According to those criteria four out of 256 isolates of *Colletotrichum* spp. were selected (M26, M28-M30) and identified

Las ampliaciones de M26 y M28-M30 fueron secuenciadas y alineadas con las del GenBank, y dieron una homología del 96, 93, 99 y 99% con *C. gloeosporioides*, respectivamente (gb/HM016794.1; gb/JF487788.1; gb/JF487788.1; gb/FJ755268.1) (BLAST, 2011).

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que *C. gloeosporioides* es el agente causal de la antracnosis en pre-cosecha de frutos de litchi de los cultivares Brewster y Mauritius en Oaxaca, México. Los hongos fueron aislados de frutos infectados de manera natural y artificial de ambos cultivares, y formaron un crecimiento micelial algodonoso blanco a gris claro con masas conidiales de color salmón en PDA. Los síntomas en frutos inoculados fueron muy similares a los observados en campo con infecciones naturales.

En esta investigación, *Colletotrichum* fue también aislado de frutos asintomáticos de Brewster; resultados similares fueron reportados por Ann *et al.*, (2004), quienes aislaron *C. gloeosporioides* de flores asintomáticas y frutos inmaduros de litchi cultivar *Black leaf*. Una vez que los frutos se cosecharon y almacenaron, desarrollaron síntomas de antracnosis, lo que sugirió que este patógeno ataca al litchi a través de infecciones latentes. Nosotros consideramos la probable naturaleza endofítica de *C. gloeosporioides* en campo.

Como se mencionó antes, la antracnosis de litchi ha sido consignada principalmente como una enfermedad postcosecha (Coates *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2003, y Liu *et al.*, 2006) que resulta de infecciones quiescentes (Li *et al.*, 2005); sin embargo, este hongo se ha reportado como agente causal de la pudrición del pedúnculo y del síntoma de *pepper spotting* en frutos de litchi en condiciones de campo

as *C. gloeosporioides* Penz; their micelial growth pattern agree with that described by Alvarez (1949); however, according to Smith and Black (1990) and Gunnell and Gluber (1992), this growth is similar to *C. fragariae* grown on PDA, but *C. fragariae* cultures on cornmeal, oatmeal, or bean-lime agar plates are dark with concentric circles and pink colored conidial masses (Brooks, 1931). In addition, the average size of the M26, and M28-M30 conidia were shorter and wider than those reported in *C. fragariae* (Smith and Black, 1990; Gunnell and Gubler, 1992).

Based on PCR amplifications through specific species primers, M26 and M28-M30 species were corroborated as *C. gloeosporioides* with a 95-100% similarity with sequences reported for the same species in the gene bank (Freeman *et al.*, 2000).

CONCLUSIONS

Anthracoze symptoms observed in litchi fruits in Oaxaca were caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. The disease was characterized by dark-brown and circular dry lesions on the exocarp and endocarp, but neither in the aril nor seed. This is the first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as the causal agent of anthracnose of litchi fruits (*Litchi chinensis*) in Oaxaca, México.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support to this project from Fundación Produce Oaxaca A.C.

LITERATURE CITED

Alvarez GLA. 1949. Anthracnose of the Annonaceae in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico* 33: 27-43.

en Australia (Cooke *et al.*, 2009). Otras causas del obscurecimiento del pericarpio en postcosecha son la pérdida de humedad debido a la disecación del pericarpio (Chen y Hong, 1992; Underhill y Critchley, 1993), degradación de antocianinas y oxidación de sustratos fenólicos por las enzimas oxidasa polifenol (Underhill y Critchley, 1993) y/o peroxidasa (Zhang y Quantick, 1997).

Las especies de *Colletotrichum* no se pueden reconocer por el rango de hospederos (Sutton, 1980, 1992), por ello la identificación y caracterización de los aislamientos obtenidos en este estudio se realizó basado en características morfológicas (Smith y Black, 1990; Gunnell y Gubler, 1992; Sutton, 1992). De acuerdo a estos criterios cuatro de los 256 aislamientos de *Colletotrichum* spp., fueron seleccionados (M26, M28-M30) e identificados como *C. gloeosporioides* Penz; su patrón de crecimiento miceliar concuerda con los descrito por Alvarez (1949); sin embargo, de acuerdo a Smith y Black (1990) y Gunnell y Gluber (1992), este crecimiento es similar a *C. fragariae* incubado en PDA, sin embargo las colonias de *C. fragariae* en placas de harina de maíz, harina de avena, o frijol-lima-agar son oscuras con círculos concéntricos y masas conidiales de color rosa (Brooks, 1931). Además, el tamaño promedio de los conidios de M26 y M28-M30 fueron más cortos y más anchos que los reportados en *C. fragariae* (Smith y Black, 1990; Gunnell y Gubler, 1992).

Basado en las amplificaciones de PCR a través de iniciadores específicos, las especies M26 y M28-M30 se corroboraron como *C. gloeosporioides* con una similaridad del 95-100% con secuencias reportadas para la misma especie en el banco de genes (Freeman *et al.*, 2000).

- Ann PJ, Tsai JN, Wang IT and Young HR. 2004. Litchi fruit anthracnose and the cause of black skin. *Plant Pathology Bulletin* 13: 299-308.
- Barnett LH and Hunter BB. 2006. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Minnesota. The American Phytopathological Society Press. 218 p.
- BLAST®. Basic Local Alignment Search Tool. Available at: blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Accessed on July 13, 2011.
- Brooks AN. 1931. Anthracnose of strawberry caused by *Colletotrichum fragariae*, n. sp. *Phytopathology* 21: 739-744.
- Campbell RJ and Campbell CW. 2001. Evaluation and introduction of lychee cultivars in South Florida, USA. *Acta Horticulturae* 558: 119-123.
- Chen HJ and Hong QZ. 1992. A study on the senescence and browning in the pericarp of litchi (*Litchi chinensis* Sonn) during storage. *Acta Horticulturae Sinica* 19: 227-232.
- Coates LM, Johnson GI, Sardud U and Cooke AW. 1994. Postharvest diseases of lychee in Australia, and their control. In: Johnson GL and Highley E (Eds.) *Development of Postharvest Handling Technology for Tropical Tree Fruits: A Workshop Held*. Bangkok: ACIAR. pp. 68-69.
- Cooke T, Persley D and House S. 2009. *Diseases of Fruit Crops in Australia*. Queensland. CSIRO Publishing. Pp: 145-148.
- Davis MJ. 2003. Lychee anthracnose inoculum sources. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 116: 12-15.
- Dinh SQ, Chongwungse J, Pongam P and Sangchote S. 2003. Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology* 32: 533-538.
- Freeman S, Minz D, Jurkevitch E, Maymon M and Shabi E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90: 608-614.
- Gunnell PS and Gubler WD. 1992. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic on strawberry. *Mycologia* 84: 157-165.
- Hanlin RT. 1990. *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Minnesota. American Phytopathological Society Press. 263 p.
- Huang X, Li J, Wang H, Huang H and Gao F. 2001. The relationship between fruit cracking and calcium in litchi pericarp. *Acta Horticulturae* 558: 209-215.
- Johnson GI and Cooke AW. 2002. Postharvest disease control in Lychee. *Acta Horticulturae* 575: 705-715.
- Johnston PR and Jones D. 1997. Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia* 89: 420-430.
- Li X, Liu A and Chen W. 2005. Studies on development and control of anthracnose of lychee fruit before and after harvest. *Acta Horticulturae* 665: 409-413.
- Liu A, Chen W and Li X. 2006. Developments of anthracnose on harvested litchi fruits and the effects of the disease on storage of the fruits. *Acta Phytopathologica Sinica* 33: 351-356.
- Liu A, Chen W and Li XY. 2003. Biological characteristics of the pathogenic fungus causing anthracnose of litchi. *Acta Phytopathologica Sinica* 33: 313-316.

CONCLUSIONES

Los síntomas de antracnosis observados en frutos de litchi en Oaxaca fueron causados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. La enfermedad se caracterizó por lesiones café obscuras y circulares en el exocarpo y endocarpo, pero no en el arilo ni semilla. Este es el primer reporte *Colletotrichum gloeosporioides* como agente causal de antracnosis de frutos de litchi (*Litchi chinensis*) en Oaxaca, México.

Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte financiero para este Proyecto de la Fundación Produce Oaxaca A.C.

~~~~~Fin de la versión en Español~~~~~

- Mills PR, Sreenivasaprasad S and Brown AE. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters* 98: 137-144.
- Mitra SK, Pereira LS, Pathak PK and Majumdar D. 2005. Fruit abscission pattern on lychee cultivars. *Acta Horticulturae* 665: 215-218.
- Nacif SR, Paoli AAS and Salomão LCC. 2001. Morphological and anatomical development of the litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn. cv. Brewster). *Fruits* 56: 225-233.
- Photita W, Taylor PWJ, Ford R, Hyde KD and Lumyong S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18: 117-133.
- Sambrook J and Russel DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Third edition. New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 46 p.
- SAS Institute. 1997. *The SAS System for Windows*. Release 6.12. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Available at: www.siap.gob.mx/agricultura-producción-anual/. Accessed on June 29, 2015.
- Smith BJ and Black LL. 1990. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease* 74: 69-76.
- Sutton BC. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti With Pycnidia Acervuli and Stroma* Surrey. Cabi Publishing. 696 p.
- Sutton BC. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA and Jeger MJ (Eds.)

- Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. Wallingford. CAB International. pp: 1-26
- Underhill SJR and Critchley C. 1993. Physiological, biochemical and anatomical changes in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp during storage. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 68: 327-335.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JH and White TJ (Eds.) PCR Protocols. Academic Press. Pp: 315-322.
- Xu X, Wu Z, Chen W and Su M. 2005. Effect of low temperature on relative enzyme activity and membrane peroxidization of lychee fruits. Acta Horticulturae 665: 359-364.
- Zhang DL and Quantick PC. 1997. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. Postharvest Biology and Technology 12: 195-02.