

Caracterización morfológica de aislados de *Colletotrichum* asociados a antracnosis en cítricos en Tuxpan Veracruz

Morphological characterization of *Colletotrichum* isolates associated to citrus anthracnose in Tuxpan, Veracruz

Allende-Molar Raúl¹✉, Alarcón-Pulido Sara Aída¹, Hernández-Sánchez María de la Luz¹, González-Cárdenas Julio César¹, Elorza-Martínez Pablo¹

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Zona Poza Rica- Tuxpan

✉ Autor para correspondencia: raallende@uv.mx

Recibido: 17/10/2019

Aceptado: 12/11/2019

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar morfológicamente aislados de *Colletotrichum* responsables de antracnosis en cítricos en Tuxpan Ver. Se utilizaron muestras de tejidos vegetales con síntomas de antracnosis para obtener aislados de *Colletotrichum*, una vez obtenidos se codificaron y se hicieron bioensayos arreglados en un diseño completamente al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones para observar el desarrollo de cada aislado. Cada uno de los aislados obtenidos fue considerado como un tratamiento. Las variables analizadas fueron tasa de crecimiento, caracterización de colonias y de apresorios. Los resultados mostraron que existieron diferencias significativas entre los tratamientos: en cuanto a su crecimiento el aislado UVA1 fue el que mostró la menor tasa de crecimiento de 6.5 mm por día, su desarrollo de micelio fue blanco casi transparente sin presencia de masas conidiales y en los otros aislados el crecimiento casi siempre fue similar con rangos de la tasa de crecimiento por día entre 8.1 a 9.0 mm por día; en cuanto a la caracterización de colonias fueron casi similares ya que el micelio en la mayoría fue abundante con masa conidiales de color salmón y masas de esclerocios de color negro. La formación de apresorios ocurrió entre 24 y 72 h.

Palabras clave: apresorios, masas conidiales, enfermedades, fitopatógeno

ABSTRACT

The objective of this work was to isolate and characterize morphologically *Colletotrichum* isolates responsible of citrus anthracnose in Tuxpan, Veracruz. Plant tissues with anthracnose symptoms were used to obtain *Colletotrichum* isolates, after that a code was assigned to each isolate. A bioassay arranged in a completely randomized design included 6 treatments and 4 repetitions was conducted to observe the development of each isolate. The analyzed variables were growth rate, colony and appressoria characteristics. Results showed that there were statistically significant differences between treatments: the isolate UVA1 showed the lowest growth rate (6.5 mm/day), with white mycelia and without spore masses; in the remaining isolates the growth rate was similar with values between 8.1 and 9.0 mm/day; the colony characteristics were similar with abundant mycelia and black sclerotial masses. Appressoria were formed between 24 and 72 h.

Keywords: appressoria, conidial masses, diseases, plant pathogen.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por hongos patógenos, representan uno de los factores limitantes para la producción de los cultivos (Trigriano *et al.*, 2004). En el caso de los cítricos, el hongo *Colletotrichum* causa la enfermedad conocida como antracnosis; la enfermedad causa entre otros daños: caída de frutos, muerte regresiva de ramas y lesiones en hojas. La reducción en la producción causada por esta enfermedad se ha documentado que es entre el 15 y 30 % y en situaciones climáticas de alta humedad relativa y temperaturas altas la incidencia y daños pueden ser mayores (Guarnaccia *et al.*, 2017). Esta enfermedad se encuentra distribuida en todas las regiones productoras de México con ataques severos en floración, fructificación y poscosecha (Becerra, 1995).

Actualmente a nivel mundial, se han reportado alrededor de 23 especies de *Colletotrichum* patogénicas en cultivos de cítricos (Ramos *et al.*, 2016; Guarnaccia *et al.*, 2017). En china, se identificaron nueve especies de *Colletotrichum* como causantes de antracnosis en cítricos: *C. gloeosporioides*, *C. fructicola*, *C. karstii*, *C. citricola*, *C. citri*, *C. brevispora*, *C. boninense*, *C. simmonsdi*, and *C. murrayae* (Peng *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013). En el estudio más reciente en Europa, tres nuevas especies fueron identificadas *C. novae-zelandiae*, *C. catinaense* and *C. limonicola* (Guarnaccia *et al.*, 2017). Estos cambios recientes, así como la detección e identificación de nuevas especies patogénicas en cítricos, justifican la realización de estudios que impliquen nuevos muestreos y la caracterización

de aislados que causen antracnosis en regiones poco estudiadas. Estos estudios podrían ayudar a predecir los riesgos de resistencia a fungicidas y a explicar las diferencias en patogenicidad y características morfológicas entre especies de *Colletotrichum* (Orozco, 2006).

La zona norte de Veracruz representa un área importante en la producción de cítricos; sin embargo, no existen estudios comparativos en morfología, patogenicidad y genética de poblaciones del hongo responsable de antracnosis. Por ello el objetivo de este trabajo fue caracterizar aislados de *Colletotrichum* asociados a antracnosis en cultivos de cítricos establecidos en la zona de Tuxpan, en el norte del estado de Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras. La recolección de muestras de antracnosis se llevó a cabo en distintas localidades del municipio de Tuxpan. Se colectaron hojas, ramas y frutos con síntomas típicos de antracnosis en huertos de cítricos. Cada muestra (10 en total) se colocó en una bolsa de papel, se depositó en una hielera y se transportó al laboratorio.

Aislamiento, purificación y preservación de aislados de *Colletotrichum*. De los frutos, hojas y ramas con síntomas de antracnosis, se seleccionaron porciones de tejido de aproximadamente 0.5 cm del área de avance de la lesión, se desinfectaron en una solución de cloro al 3 % durante 2 min, después se colocaron en alcohol etílico durante 30 s; posteriormente se

colocaron en agua destilada por 1 minuto y finalmente, se colocaron en papel absorbente. Las muestras desinfectadas se colocaron en placas de medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) suplementado con cloranfenicol (0.25 g/l) y se incubaron a 25°C (Aiello *et al.*, 2015). La purificación se llevó a cabo mediante la técnica de transferencia de puntas de hifas la cual consistió en transferir con la ayuda de una aguja esterilizada una nueva porción de micelio de la colonia en crecimiento activo a nuevas cajas Petri con. Una vez que se obtuvieron los aislados purificados, la preservación se realizó al colocar un disco de crecimiento micelial del aislado purificado, de colonias de al menos 7 días de edad, en tubos de ensayo con medio de cultivo PDA inclinado.

Caracterización morfológica de aislados. La caracterización morfológica de los aislados de *Colletotrichum* incluyó el registro de crecimiento micelial en medio de cultivo y el aspecto de la colonia (Orozco, 2006). La tasa de crecimiento de todos los aislados se determinó de la siguiente manera: Discos miceliales de 8 mm de diámetro se tomaron de áreas en crecimiento activo de colonias de 6 días de edad y se transfirieron a placas Petri de 8 cm de diámetro con agar papa dextrosa (PDA), las cuales se incubaron a 25°C se evaluaron cuatro réplicas de cada aislado. El diámetro de la colonia se midió diariamente durante 8 días y se calculó la tasa de crecimiento en mm por día. Adicionalmente se registró el color de la colonia, la textura y la presencia de masas conidiales (Ramos *et al.*, 2016).

Inducción de formación de apresorios. Los apresorios conidiales se indujeron al colocar conidios en dos gotas de agua destilada sobre un portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos se colocaron dentro de un placa Petri que contenía algodón humedecido con agua destilada esterilizada y se incubaron a 25°C en oscuridad (Peng *et al.*, 2012).

Diseño experimental y análisis estadístico. La tasa de crecimiento de los aislados obtenidos se analizó bajo un diseño estadístico completamente al azar. Cada aislado se consideró como un tratamiento y cada tratamiento tuvo 4 repeticiones. La variable experimental fue el diámetro de la colonia, la cual se midió diariamente durante 8 días y se calculó la tasa de crecimiento en mm por día.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los recorridos por las parcelas cítricas de Tuxpan, Veracruz se observaron los síntomas típicos de antracnosis: Las hojas presentaron manchas necróticas a diferencia del fruto la expresión de *Colletotrichum* se manifiesta con puntos concéntricos de color café oscuro, las manchas crecían paulatinamente hasta unirse y necrosar (Figura 1). Esto concuerda con Orozco *et al.* (2006) quienes mencionan que los síntomas presentados en hojas y frutos son similares a los de nuestras muestras. Se colectaron un total de 10 muestras con síntomas de antracnosis de las cuales se logró el aislamiento de 6 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislados de *Colletotrichum* obtenidos de infecciones de antracnosis en tejidos de cítricos de Tuxpan Veracruz

Código	Tejido	Huésped	Localidad
UVA1	Hoja	Toronja	Higueral

UVA3	Hoja	Naranja	Coloman
UVA5	Hoja	Naranja	La camelia
UVA6	Fruto	Toronja	Higueral
UVA7	Hoja	Limón	Cañada Rica
UVA10	Fruto	Mandarina	Buenos Aires



Figura 1. Síntomas de antracnosis. A: En hojas de *C. sinensis* B. En fruto de *C. paradisi*

Las colonias de los hongos presentaron diferencias morfológicas durante su observación durante 8 días de edad, ya que existió variación en su tamaño de crecimiento en el medio de cultivo PDA. Los aislados de *Colletotrichum* a

los 8 días de crecimiento mostraron diferencias estadísticas significativas ya que los aislados UVA5, UVA7 y UVA10 tuvieron el mayor desarrollo y el aislado UVA1 fue el que presentó menor crecimiento (Figura 2).

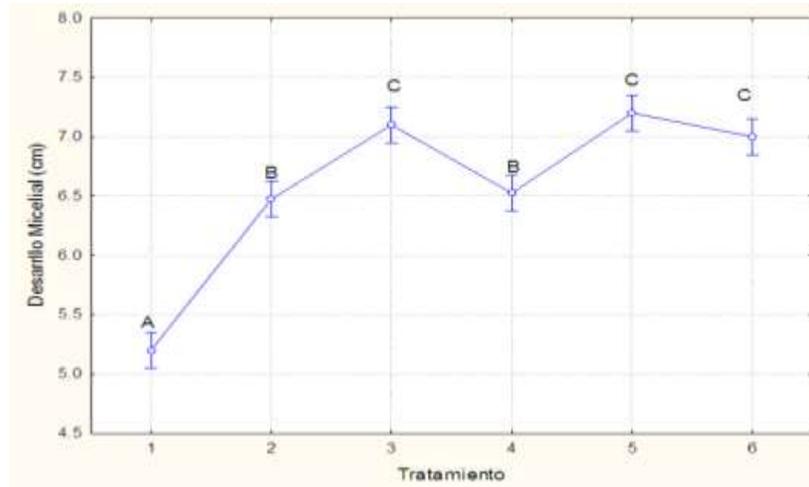


Figura 2. Crecimiento de aislados de *Colletotrichum* en medio de cultivo PDA a los 8 días. Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($P= 0.05$). Tratamientos (aislados) 1=UVA1, 2=UVA3, 3=UVA5, 4=UVA6, 5=UVA7, 6=UVA10.

El aislado UVA7 fue el que tuvo mayor tasa de crecimiento con una tasa de 9.0 mm por día; mientras que, el UVA1 tuvo un crecimiento de 6.5 mm por día (Cuadro 2). Las tasas de crecimiento de los aislados de *Colletotrichum*

provenientes de cítricos fue menor a la reportada por Santacruz (2013) cuando evaluó el crecimiento en aislados de *Colletotrichum* en ají y encontró tasas que fluctuaron entre 7 y 13 mm/día.

Cuadro 2. Tasa de crecimiento micelial de los aislados de *Colletotrichum* provenientes de cítricos de Tuxpan, Veracruz.

Aislados	mm/día
UVA1	6.5
UVA3	8.1
UVA5	8.9
UVA6	8.2
UVA7	9.0
UVA10	8.8

Caracterización de colonias. En la mayoría se observaron halos concéntricos con presencia de masas de esporas, con excepción del islado UVA1 y UVA6 en los que no se observaron masas de esporas. Se manifestaron diferentes tipos de texturas en las colonias, tales como algodonosas, poco densas, con masas de

esclerocios color negro y masa de esporas color naranja- salmón (Figura 3). Estos resultados son similares a los observados por Orozco (2006) en antracnosis en cítricos. Las masas conidiales de color salmón y negras en distribución concéntrica con micelio abundante y algodonoso de color blanco fueron reportadas también por

Trinidad *et al.* (2017) y Santacruz (2013) y observadas en los aislados UVA3 y UVA10 de

nuestro estudio.

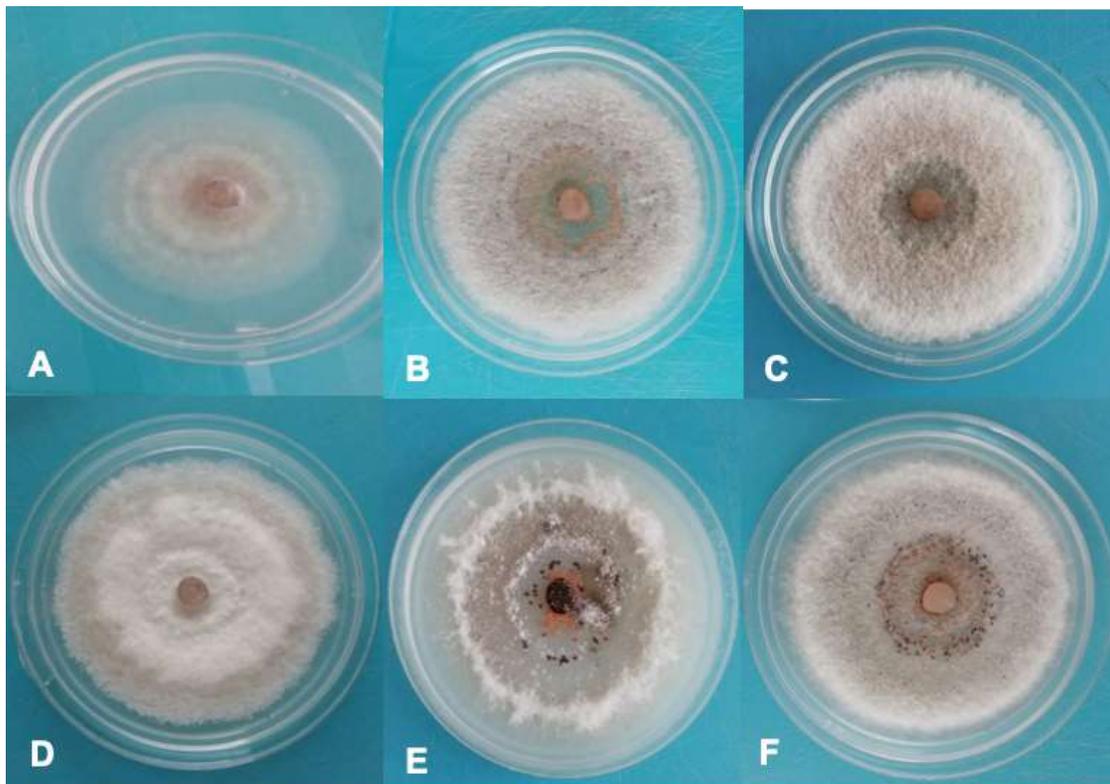


Figura 3. Aislados de *Colletotrichum* a los 8 días de crecimiento en medio de cultivo PDA. A= UVA1, B=UVA3, C=UVA5, D=UVA6, E=UVA7, F=UVA10

Caracterización de apresorios. A las 24 horas los aislados UVA1, UVA5, UVA6 y UVA7 mostraron la presencia de apresorios; a las 48 se observaron en el aislado UVA3 y en el aislado UVA10 los apresorios se observaron a las 72 h (Figura 4). Los apresorios observados tuvieron una forma lobulada y globosa; esta forma concuerda con Orozco (2006) quien obtuvo apresorios de forma lobulados en aislamientos

de *C. gloeosporioides* causantes de antracnosis en limón. La formación temprana (24 h) de apresorios en los aislados UVA1, UVA5, UVA6 y UVA7 podría significar una mayor virulencia o capacidad de infección pues los apresorios están relacionados con la penetración directa que hace el hongo *Colletotrichum* en los tejidos susceptibles de infección.

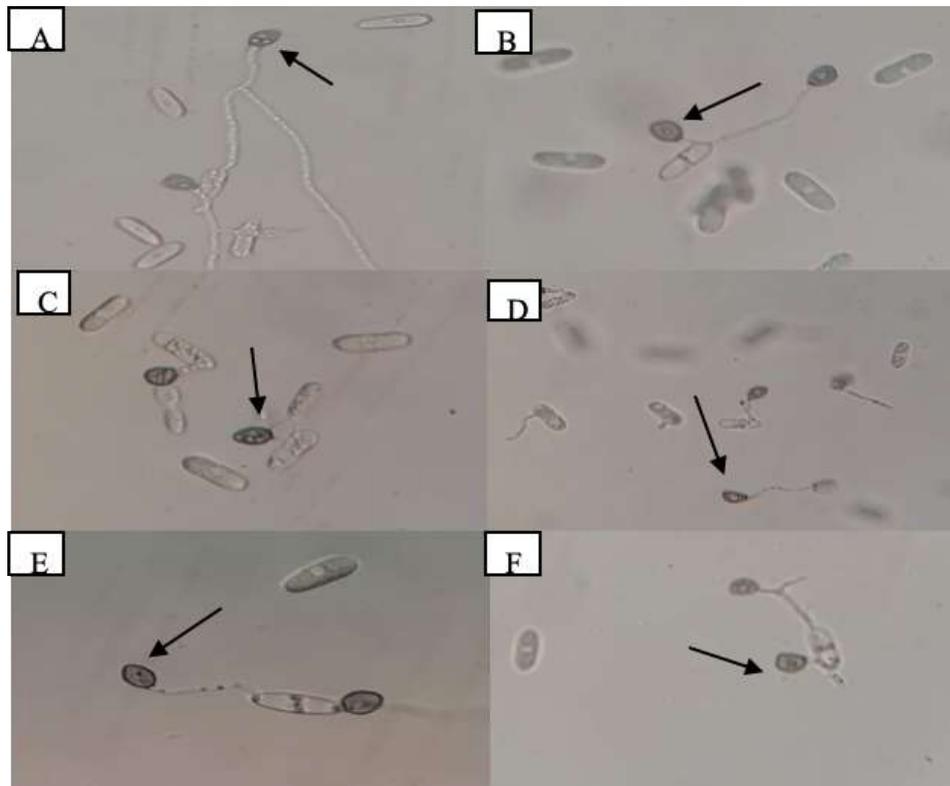


Figura 4. Apresorios de aislados de *Colletotrichum* provenientes de antracnosis en cítricos en Tuxpan, Veracruz. A= UVA1, B=UVA3, C=UVA5, D=UVA6, E=UVA7, F=UVA10

CONCLUSIONES

En este estudio se evidenció que existe variabilidad morfológica en los aislados de *Colletotrichum* asociados a infecciones de antracnosis en cítricos en Tuxpan, Veracruz. Se obtuvieron más aislados a partir de hojas ya que en este tejido las lesiones son más visibles y frecuentes. De acuerdo al trabajo realizado, se observó que existe variabilidad: en la morfología de colonias, ya que existieron colonias con micelio aéreo y otras con micelio ralo; en el crecimiento, ya que la tasa de crecimiento varió entre 6.5 y 9.0 mm/día; y en la formación de apresorios ya que su producción varió desde 24 a 72 h. Este primer estudio de la variabilidad morfológica de aislados de *Colletotrichum* asociados a antracnosis de cítricos en Tuxpan,

Veracruz servirá de base para estudios futuros relacionados con la identificación de especies, su distribución en la zona y su sensibilidad a los fungicidas.

AGRADECIMIENTOS

A la SEP/DGESU por el financiamiento al proyecto PRODEP UV-PTC-872.

LITERATURA CITADA

Aiello D, Carrieri R, Guarnaccia V, Vitale A, Lahoz E and Polizzi G. 2015. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* causing preharvest disease on

- Citrus sinensis* in Italy. Journal of Phytopathology 163:168-177
<https://doi.org/10.1111/jph.12299>
- Becerra, L. E. N. 1995. Enfermedades del cultivo de mango. pp. 83-101. En: Inocente Mata Beltrán y Raúl Mosqueda Vázquez (eds.). La Producción de Mango en México. Noriega Editores. México, D.F. 159 p.
- Guarnaccia V, Groenewald JZ, Polizzi G, Crous PW. 2017. High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. Persoonia 39:32-50
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.02>
- Huang F, Chen GQ, Hou X, Fu YS, Cai L, Hyde KD, Li HY. 2013. *Colletotrichum* spp. associated with cultivated Citrus in China. Fungal diversity 61:61-74
<https://doi.org/10.1007/s13225-013-0232>
- Orozco S. M. (2006). Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de *Colletotrichum acutatum* Simmonds de cítricos en México. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima 91 pp.
- Orozco S. M., Medina U.V.M., Robles G. M., Orozco R. J., Pérez Z. O., Velázquez M.J.J., Timmer, L.W. y Guzmán G. S. (2006). Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC. Campo Experimental Tecmán. Folleto Técnico Núm. 2. 73 p.
- Peng LJ, Yang Y, Hyde KD, Bahkali AH, and Liu Z. 2012. *Colletotrichum* species on *Citrus* leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. Cryptogamie, Mycologie 33:267-283
<https://doi.org/10.7872/crym.v33.iss3.2012.267>
- Ramos AP, Thalinhas P, Sreenivasaprasad S, Oliveira H. 2016. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C. karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. Phytoparasitica 44:549-561
<https://doi.org/10.1007/s12600-016-0537-y>
- Santacruz D. C. X 2013. Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del fruto de ají y pimentón *capsicum* spp. en el valle del cauca. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. 97pp.
- Trigriano, R.N., Windham, M.T., and Windham, A.S. (Eds.). 2004. Plant Pathology. Concepts, and laboratory exercises. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 413 p.
- Trinidad A.E., Ascencio V.F., Ulloa J.A., Ramírez R.J.C., Ragazzo S.J.A., Calderón S.M. y Bautista R.P.U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate Nayarit, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 19, 12.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>

Copyright (c) 2019 Raúl Allende-Molar, Sara Aída Alarcón-Pulido, María de la Luz Hernández-Sánchez, Julio César González-Cárdenas, Pablo Elorza Martínez



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](#).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia - Texto completo de la licencia](#)