

Histopathology of the infection process of *Colletotrichum truncatum* in papaya and pea leaves

Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo

Indira Rojo-Báez, Raymundo S. García-Estrada, Josefina León-Félix, Adriana Sañudo-Barajas, Raúl Allende-Molar* Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación Culiacán. Carretera Culiacán-Eldorado km 5.5, Campo el Diez, CP. 80110, Culiacán, Sinaloa, México. *Autor para correspondencia: rallende@ciad.mx.

Recibido: 14 de Abril, 2016

Aceptado: 18 de Junio, 2016

Rojo-Báez I, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2016. Histopatología del proceso de infección de *Colletotrichum truncatum* en hojas de papaya y chícharo. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 316-325.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1604-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-3)

Primera publicación DOI: 21 de Junio, 2016

First DOI publication: June 21st, 2016

Resumen. *Colletotrichum truncatum* es un hongo patógeno causante de antracnosis en diversos hospedantes; se desconoce el proceso de infección de este patógeno en hojas de papaya, así como el comportamiento de una misma cepa de *C. truncatum* en distintos hospedantes. El objetivo de este estudio fue describir, mediante técnicas histológicas, el proceso de infección de una cepa de *C. truncatum* en hojas de papaya y chícharo. En los dos hospedantes, la penetración del hongo ocurrió de manera directa por medio de apresorios alrededor de las 20 h después de la inoculación (hdi). En papaya, las hifas crecieron intercelularmente a las 24-60 hdi; la colonización necrotrófica inició a las 60 hdi; hifas intracelulares crecieron en células del

Abstract. *Colletotrichum truncatum* is a pathogenic fungus causing anthracnose in several hosts; the infection process of this pathogen in papaya leaf as well as studies of the same strain of *C. truncatum* in different hosts is unknown. The aim of this study was to describe the infection process of a *Colletotrichum truncatum* strain by histological techniques in papaya and pea leaves. In both hosts, direct penetration occurred through appressoria around 20 h after inoculation (hai). In papaya, intercellular hyphae grew at 24-60 hai; the necrotrophic colonization began at 60 hai; intracellular hyphae grew in mesophyll cells causing extensive cellular degradation; in contrast, in pea primary infection hyphae began at 36 hai, secondary infection hyphae (necrotrophic state) began at 72 hai. In both hosts, the acervuli were observed at 96 hai, which was associated with typical anthracnose lesions. *C. truncatum* behaved as intramural subcuticular pathogen in papaya and as intracellular pathogen in pea; so that, the infection strategy is dependent on the host.

Keywords: *Carica papaya*, *Pisum sativum*,

mesófilo causando una extensiva degradación celular; en contraste, en chicharo se observaron hifas primarias de infección a partir de las 36 hdi, las hifas secundarias de infección (estado necrótico) se observaron a las 72 hdi. En ambos hospedantes, los acérvulos se observaron a las 96 hdi, lo cual se asoció con la producción de lesiones típicas de antracnosis. *Colletotrichum truncatum* se comportó como patógeno intramural subcuticular en papaya y como hemibiótrofo intracelular en chicharo; por lo que la estrategia de infección es dependiente del hospedante.

Palabras clave: *Carica papaya*, *Pisum sativum*, patógeno intramural, patógeno intracelular.

Colletotrichum spp., agentes causales de la antracnosis, afectan a un amplio rango de hospedantes en pre y poscosecha. Las especies de *Colletotrichum* emplean diferentes estrategias de infección: intramural subcuticular o intracelular; incluso, ambas en distintos órganos del mismo hospedero (Perfect *et al.*, 1999; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2005). Las estrategias de infección están correlacionadas con la especificidad en el hospedante (Pring *et al.*, 1995), por lo que es importante conocer el proceso de infección para determinar el ciclo biológico de la enfermedad, lo que podría sugerir el uso adecuado de una estrategia de control al conocer el periodo en el que se desarrolla el patógeno en el hospedante. La antracnosis es una de las principales enfermedades en el cultivo de papaya. En México, las pérdidas reportadas superan el 50 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). *Colletotrichum truncatum* se reportó en 2008 como causante de antracnosis en papaya (*Carica papaya*) en México (Tapia-Tusell *et al.*, 2008), con una incidencia de hasta 40 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). Esta especie utiliza mecanismos de infección distintos, ya que se comporta como

intramural pathogen, intracellular pathogen.

Colletotrichum spp., causal agents of anthracnose, affect a wide range of hosts in both pre- and post-harvest. The species of *Colletotrichum* use different infection strategies: intramural subcuticular or intracellular, or even both in different organs of the same host (Perfect *et al.*, 1999; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2005). Infection strategies are correlated with the specificity in the host (Pring *et al.*, 1995), which is why it is important to know the infection process to determine the biological cycle of the disease, which could suggest the adequate use of a control strategy once we know the period in which the pathogen is developed in the host.

Anthracnose is one of the main diseases in papaya crops. In Mexico, reported losses are above 50 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). *Colletotrichum truncatum* was reported in 2008 as the cause of anthracnose in papaya (*Carica papaya*) in Mexico (Tapia-Tusell *et al.*, 2008), with an incidence of up to 40 % (Torres-Calzada *et al.*, 2012). This species uses different infection mechanisms, since it behaves like an intracellular hemibiotrophic pathogen in pea (*Pisum sativum*), broad bean (*Vicia faba*), and lentil plants (*Lens culinaris*) (O'Connell *et al.*, 1993; Latunde-Dada and Lucas, 2007), and as a subcuticular intramural pathogen in chili pepper (*Capsicum annum*), chickpea (*Cicer arietinum*), peanut (*Arachis hypogaea*), and bean plants (*Phaseolus vulgaris*) (Pring *et al.*, 1995; Ranathunge *et al.*, 2012). Although there are diverse studies related to this species, the process of pathogenesis is unknown for papaya leaves; also, there is scarce information describing the infection process of a same strain of the pathogen in different hosts. The aim of this study was to describe the histological changes presented during the infection of papaya and pea leaves by *C. truncatum*.

We used healthy Maradol papaya (three months

patógeno hemibiotrófico intracelular en chícharo (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*) y lenteja (*Lens culinaris*) (O'Connell *et al.*, 1993; Latunde-Dada y Lucas, 2007) y como patógeno intramural sub-cuticular en chile (*Capsicum annuum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), cacahuete (*Arachis hypogaea*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Pring *et al.*, 1995; Rathanunge *et al.*, 2012). Aunque existen diversos estudios relacionados con esta especie, se desconoce el proceso de patogénesis en hojas de papaya; además, existe escasa información en donde se describa el proceso de infección de una misma cepa del patógeno en distintos hospedantes. El objetivo de este estudio fue describir los cambios histológicos que se presentan durante la infección de hojas de papaya y chícharo por *C. truncatum*.

Se utilizaron hojas de plantas sanas de papaya Cv. Maradol (tres meses de edad) y chícharo Cv. Lincoln (tres semanas de edad). La cepa CCM de *C. truncatum* se utilizó como inóculo. Previamente se aisló de un fruto de papaya con síntomas de antracnosis, se purificó mediante cultivo monospórico y se caracterizó molecularmente (KF147902). La suspensión de conidios se preparó a una concentración de 1×10^6 esporas/mL a partir de un cultivo de siete días de crecimiento en PDA. La superficie abaxial de 15 hojas de papaya y 30 hojas de chícharo, previamente desinfectadas con etanol al 70 %, se inoculó en seis y tres puntos de 1 cm^2 respectivamente, por deposición de $10 \mu\text{L}$ de inóculo. Como tratamiento testigo, se colocaron alícuotas de $10 \mu\text{L}$ de agua destilada estéril en cinco hojas de papaya y 10 hojas de chícharo. Las hojas de papaya se colocaron en bolsas de polietileno con papel absorbente humedecido con agua destilada (Pandey *et al.*, 2012) y las de chícharo en cajas Petri de vidrio con papel filtro Whatman N° 2 esterilizado y humedecido con agua destilada para incrementar la humedad relativa. Todas las hojas se incubaron a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante seis días. Se tomaron sec-

old) and Lincoln pea leaves (three months old). The CCM strain of *C. truncatum* was used as an inoculum. Beforehand, it was isolated from a papaya fruit with anthracnose symptoms, purified using monosporic cultivation, and characterized molecularly (KF147902). The conidia suspension was prepared at a concentration of 1×10^6 spores/mL from a culture grown for 7 days in PDA. The abaxial surfaces of 15 papaya leaves and 30 pea leaves, previously disinfected with ethanol at 70 %, were inoculated in six and three points of 1 cm^2 respectively, by depositing $10 \mu\text{L}$ of inoculant. As a control treatment, $10 \mu\text{L}$ aliquots of sterile distilled water were placed on five papaya leaves and 10 pea leaves. The papaya leaves were placed in polyethylene bags with pieces of paper towels moistened with distilled water (Pandey *et al.*, 2012), and the pea leaves were placed in glass Petri dishes with N° 2 Whatman filter paper, sterilized and moistened with distilled water to increase the relative humidity. All leaves were incubated at $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for six days. Sections of 5 mm of tissue were taken from the inoculated areas at 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120, and 148 hours after inoculation (hai), and placed in plastic cassettes to include them in paraffin. The samples were submerged in an FAA fixing solution (10 % formaldehyde, 5 % acetic acid, 50 % ethanol at 96%) for at least 24 h. Later, the tissues were gradually dehydrated with ethyl alcohol (50, 70, 80, 96, and 100 %) and filtrated in (Leica) paraffin for 3 h, after having been transferred in absolute alcohol-xylene (v/v) and xylene (twice) (Rodríguez-López *et al.*, 2013). The samples were kept in the solutions for 3 h and finally shaken twice in a centrifugal tissue processor (Thermo Scientific, STP 120, GER).

In an embedding workstation (Thermo Scientific, HistoStar, UK), the samples were placed in metallic molds with molten paraffin, they were

ciones de 5 mm de tejido de las áreas inoculadas a las 2, 4, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 148 horas después de la inoculación (hdi), y se colocaron en casetes de plástico para incluirlas en parafina. Las muestras se sumergieron en solución fijadora FAA (10 % formaldehído, 5 % ácido acético, 50 % etanol al 96%) durante al menos 24 h. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron gradualmente con alcohol etílico (50, 70, 80, 96 y 100 %) y se infiltraron en parafina (Leica) durante 3 h, previa transferencia en alcohol absoluto-xileno (v/v) y xileno (dos veces) (Rodríguez-López *et al.*, 2013). Las muestras permanecieron en las soluciones durante 3 h y finalmente, se agitaron dos veces en un procesador de tejidos centrífugo (Thermo Scientific, STP 120, GER).

En un centro de inclusión (Thermo Scientific, HistoStar, UK), las muestras se colocaron en moldes metálicos con parafina fundida, se les colocó un casete de plástico, se agregó parafina fundida y se dejaron enfriar. Las muestras se cortaron longitudinalmente y transversalmente con respecto a la nervadura central a 6 μm de grosor en un micrótomó semiautomático (Thermo Scientific, Microm HM340E, GER). Las secciones obtenidas se tiñeron con safranina (Sigma) al 1 % en alcohol etílico al 50 % y verde-rápido (Sigma) al 1 % en etanol al 96 %, se montaron en resina Entellan (Merck) y se secaron durante 24 h (Casarrubias-Carrillo *et al.*, 2002). Las laminillas se observaron en un microscopio óptico marca Carl Zeiss AxioStar Imager A2 con cámara integrada para identificar los daños en tejido. Se realizaron 36 observaciones por muestra. Los apresorios se midieron con el software ZEN 2012 (blue edition).

Entre las 2 y 18 hdi sólo se observaron conidios de *C. truncatum* sin germinar en la superficie de la hoja. La germinación inició a partir de las 20 hdi, y en el extremo apical de los tubos germinativos se formaron apresorios melanizados de color café

added a in plastic cassettes, molten paraffin was added, and they were left to cool. The samples were cut longitudinally and transversely to the 6 μm thick midrib in a semiautomatic microtome (Thermo Scientific, Microm HM340E, GER). The sections obtained were dyed with safranin (Sigma) at 1 % in ethyl alcohol at 50 % and fast green (Sigma) at 1 % in ethanol at 96 %, they were mounted on Entellan resin (Merck) and left to dry for 24 h (Casarrubias-Carrillo *et al.*, 2002). The lamellae were observed under a Carl Zeiss AxioStar Imager A2 optical microscope with an integrated camera to identify tissue damage. Thirty-six observations were carried out for every sample. The appressoria were measured using the software ZEN 2012 (blue edition).

Between 2 and 18 hai only non-germinated *C. truncatum* conidia were observed on the surface of the leaf. Germination began after 20 hai, and on the apical end of the germination tubes, dark brown melanized appressoria were formed, balloonlike to irregularly shaped, and on average, 7.67 x 5.26 μm (Figura 1A). *C. truncatum* formed melanized appressoria to improve adhesion and penetration, by mechanical action and enzyme lysis (Kubo *et al.*, 2000). The first infection hyphae emerged from the appressoria 24-48 hai (Figure 1B). In the interval of 24-60 hai, intramural hyphae were observed, which grew on cell walls (Figure 1C). At 60 hai we observed the start of the necrotrophic state, since intracellular hyphae were observed (Figure 1D); also, cavities were observed (Figure 1E), which according to Pring *et al.* (1995) are indicative of cell wall degradation. The acervuli (Figure 1E) were related to the dark coloration on the surface of the host in contrast with the control leaf, which showed no symptoms (Figure 1F). At 96 hai, the pathogen completed its life cycle and produced acervuli with conidia, which are the inoculum source for infections in new tissues (Ranathunge

oscuro, de forma globosa a irregular, y de $7.67 \times 5.26 \mu\text{m}$ en promedio (Figura 1A). *C. truncatum* formó apresorios melanizados para facilitar la adhesión y la penetración, por medio de acción mecánica y lisis enzimática (Kubo *et al.*, 2000). Las primeras hifas de infección emergieron de los apresorios a partir de las 24-48 hdi (Figura 1B). En el lapso de 24-60 hdi se observaron hifas intramurales, las cuales crecieron en las paredes celulares (Figura 1C). A las 60 hdi se observó el inicio del

et al., 2012). The cell damage and the production of acervuli were associated with the appearance of dark, brown to black semicircular lesions, on the third day after inoculation (Figure 2A), in contrast with the control leaf (Figure 2B).

The infection strategy of *C. truncatum* in pea leaves was different. The conidia did not germinate until 12 hai. At 18 hai, the germination tubes emerged in a polar and lateral way. From the germination tubes, dark brown melanized appressoria were

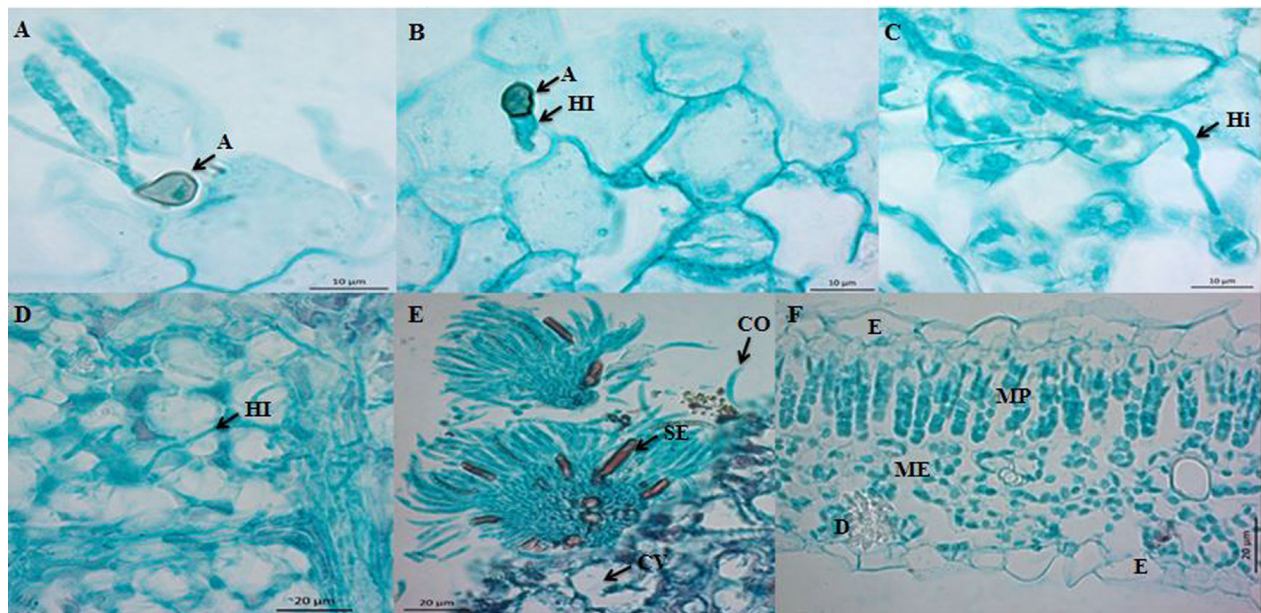


Figura 1. Microfotografías del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas escindidas de papaya cv Maradol. A) Corte longitudinal de hoja a las 20 hdi, formación de apresorios melanizados (A) a partir de tubos germinativos polares de conidios. Barra = $10 \mu\text{m}$. B) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 24 hdi. Primeras hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A). Barra = $10 \mu\text{m}$. C) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 60 hdi. Hifa intramural (Hi). Barra = $10 \mu\text{m}$. D) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 60 hdi. Hifa intracelular (HI). Barra = $20 \mu\text{m}$. E) Corte trasversal de hoja de papaya infectada por *C. truncatum* 96 hdi, formación de acérvulo en el hospedante, conidióforos (CO), setas incrustadas (SE) y cavidades (CV). Barra = $20 \mu\text{m}$. F) Corte trasversal de hoja sana. Epidermis (E), mesófilo en empalizada (MP), mesófilo esponjoso (ME) y drusa (D). Barra = $20 \mu\text{m}$.

Figure 1. Microphotographs of the infection process of *C. truncatum* on detached Maradol papaya leaves. A) Longitudinal cut of a leaf 20 hai, formation of melanized appressoria (A) from polar germination tubes from conidia. Bar = $10 \mu\text{m}$. B) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 24 hai. First infection hyphae (IH) emerging from appressoria (A). Bar = $10 \mu\text{m}$. C) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 60 hai. Intramural hypha (iH). Bar = $10 \mu\text{m}$. D) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 60 hai. Intracellular hypha (HI). Bar = $20 \mu\text{m}$. E) Transversal cut of a papaya leaf infected by *C. truncatum* 96 hai, formation of acervulus in the host, conidiophores (CO), embedded setae (SE), and cavities (CV). Bar = $20 \mu\text{m}$. F) Transversal cut of a healthy leaf. Epidermis (E), palisade mesophyll (MP), spongy mesophyll (ME), and druse (D). Bar = $20 \mu\text{m}$.

estado necrótico, ya que se observaron hifas intracelulares (Figura 1D); además, se observaron cavidades (Figura 1E), que de acuerdo con Pring *et al.* (1995) son indicativas de la degradación de paredes celulares. Los acérvulos (Figura 1E) se asociaron con la coloración oscura en la superficie del hospedante en contraste con la hoja testigo, la cual no presentó síntomas de enfermedad (Figura 1F). A las 96 hdi, el patógeno completó su ciclo de vida al producir acérvulos con conidios, los cuales son la fuente de inóculo para infecciones en nuevos tejidos (Ranathunge *et al.*, 2012). El daño celular y la producción de acérvulos se asociaron con la aparición de lesiones oscuras semicirculares de coloración marrón a negro, al tercer día después de inoculación (Figura 2A), en contraste con la hoja testigo (Figura 2B).

La estrategia de infección de *C. truncatum* en ho-

formed, balloonlike to irregularly shaped, and measuring $8.24 \times 5.92 \mu\text{m}$ on average. The first infection hyphae emerged from the appressoria between 18 and 20 hai, unlike what occurred in the papaya leaf (Figure 3A). We observed lobulated, intracellular branched (primary) hyphae between 36 hai and 60 hai (Figure 3B). Although the primary infection hyphae appeared in the cell lumen, no lysis was observed. The main characteristic of the intracellular invasion is the formation of primary infection hyphae, which can have different morphologies depending on the species (O'Connell *et al.*, 2000). The primary hypha of *C. truncatum* is multilobulated, branched, and large (Latunde-Dada and Lucas, 2007). During the biotrophic state, the primary hypha was invaginated towards the cell lumen (Figure 3B). According to O'Connell *et al.* (2000), the primary hypha forms an interfacial

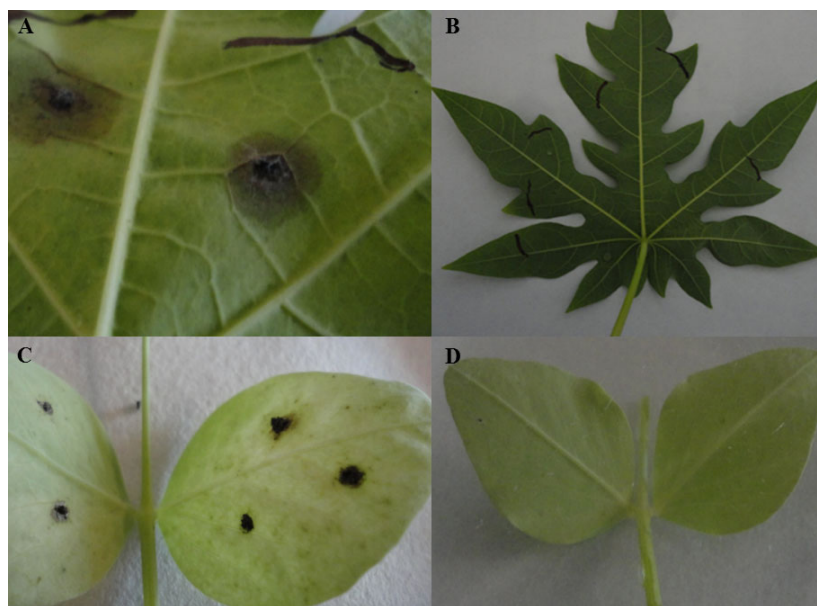


Figura 2. Síntomas de antracnosis ocasionados por la cepa CCM de *C. truncatum* en distintos hospedantes. A) Hoja de papaya Maradol con síntomas de antracnosis a las 148 hdi; B) Hoja de papaya testigo; C) Hoja de chícharo Lincoln con síntomas de antracnosis a las 148 hdi; D) Hoja de chícharo testigo.

Figure 2. Anthracnose symptoms by the CCM strain of *C. truncatum* in different hosts. A) Maradol papaya leaf with symptoms of anthracnose 148 hai; B) Control papaya leaf; C) Lincoln pea leaf with anthracnose symptoms 148 hai; D) Control pea leaf.

jas de chícharo fue distinta. Los conidios permanecieron sin germinar hasta las 12 hdi. A las 18 hdi, los tubos germinativos emergieron de manera polar y lateral. A partir de los tubos germinativos se formaron apresorios melanizados de color café oscuro, de forma globosa a irregular, y de $8.24 \times 5.92 \mu\text{m}$ en promedio. Las primeras hifas de infección emergieron de los apresorios entre las 18 y 20 hdi a diferencia de lo que ocurrió en hoja de papaya (Figura 3A). Se observaron hifas lobuladas, ramificadas intracelulares (hifas primarias) de las 36 hdi hasta las 60 hdi (Figura 3B). A pesar de que las hifas primarias de infección se presentaron en el lumen celular, no se observó lisis. La principal característica de la invasión intracelular es la formación de hifas primarias de infección; éstas pueden tener diferente morfología según la especie (O'Connell *et al.*, 2000). La hifa primaria de *C. truncatum* es multilobulada, ramificada y grande (Latunde-Dada y Lucas, 2007). Durante el estado biótrofo, la hifa primaria se invaginó hacia el lumen celular (Figura 3B). De acuerdo con O'Connell *et al.* (2000), la hifa primaria forma una matriz interfacial compuesta de glicoproteínas ricas en prolina e hidroxiprolina que separa a la hifa de la membrana plasmática del hospedante.

Se observaron hifas de infección delgadas (hifas secundarias), las cuales emergieron de hifas primarias de infección a las 72 hdi (Figura 3C). Según Bhadauria *et al.* (2011), la transición del estado biótrofo al necrótrofo se asocia con el desarrollo de hifas secundarias delgadas, las cuales maceran los tejidos del hospedante. Las hifas secundarias colonizaron células de manera intracelular, lo cual ocasionó daño celular con la formación de cavidades celulares (Figura 3D). De acuerdo con Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002) las cavidades celulares indican disolución celular. La formación de acérvulos inició a partir de las 96 hasta las 148 hdi y éstos contenían conidióforos, setas melanizadas y con-

matrix composed of glycoproteins, rich in proline and hydroxyproline that separates the plasmatic membrane from the host.

We observed thin infection hyphae (secondary hyphae), which emerged from the primary infection hyphae 72 hai (Figure 3C). According to Bhadauria *et al.* (2011), the transition from the biotrophic state to the necrotrophic state is associated with the growth of thin secondary hyphae, which soften the host's tissues. The secondary hyphae colonized cells intracellularly, which caused cell damage with the formation of cell cavities (Figure 3D). According to Casarrubias-Carrillo *et al.* (2002) cell cavities indicate cell dissolution. The formation of acervuli began 96 hai until 148 hai and they contained conidiophores, melanized setae and conidia (Figure 3E), in contrast with the healthy leaf (Figure 3F). Cell damage was associated with the symptoms of anthracnose (Figure 2C), in contrast with the control leaf, which presented no symptoms (Figure 2D). Unlike the study carried out by O'Connell *et al.* (1993), the strain of *C. truncatum* used in this investigation produced acervuli in pea. The acervuli with conidia were produced starting at 96 hai, thus concluding the life cycle of the pathogen. The symptoms of anthracnose in pea leaves at 148 hai were limited in extension, in contrast to those observed in papaya, probably due to the strain originally being isolated from the papaya fruit.

CONCLUSION

This study showed that the CCM strain of *C. truncatum* behaved as a subcuticular intramural pathogen in papaya, and as an intracellular hemibiotrophe in pea, therefore the infection process depends on the host.

ACKNOWLEDGEMENTS

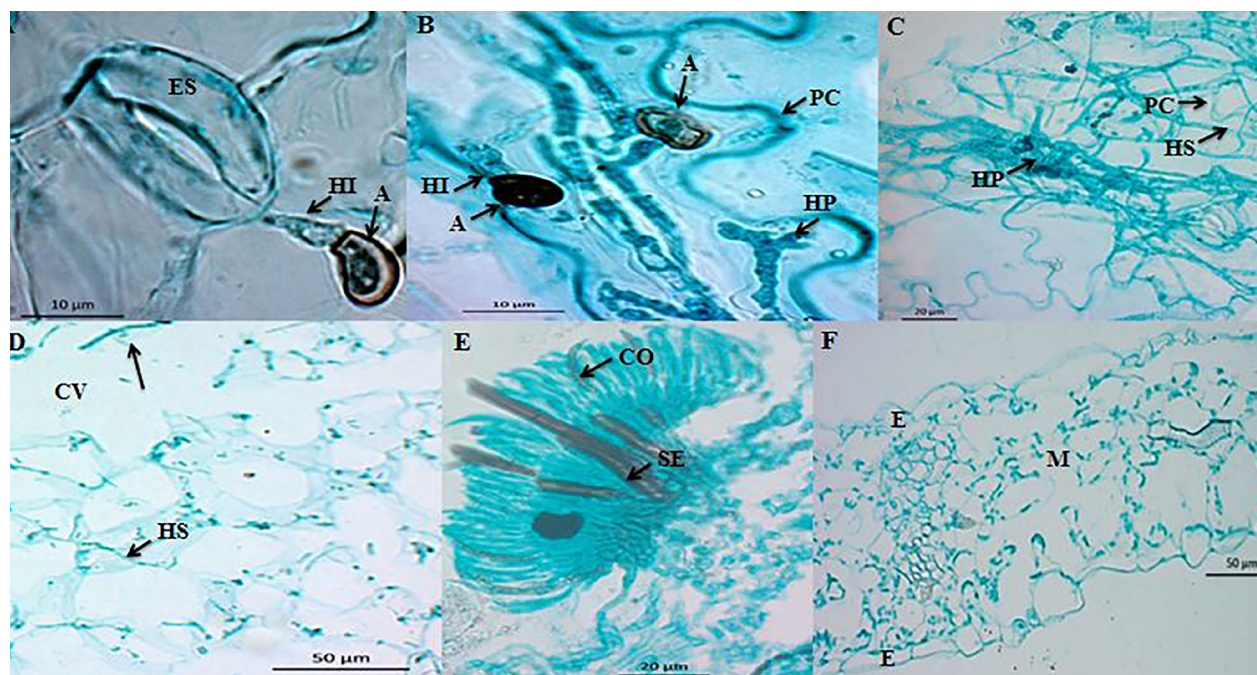


Figura 3. Microfotografías del proceso de infección de *C. truncatum* en hojas escindidas de chícharo cv Lincoln. A) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 18 hdi. Primeras hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A). Barra = 10 μ m. B) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 36 hdi. Hifas de infección (HI) emergiendo de apresorios (A), así como hifa primaria (HP) lobulada delimitada por la pared celular (PC) del hospedante. Barra = 10 μ m. C) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 72 hdi. Hifas secundarias (HS) emergiendo de hifas primarias (HP), las cuales atraviesan las paredes celulares (PC) del hospedante. Barra = 20 μ m. D) Corte longitudinal (paradermal) de hoja a las 72 hdi. Hifas secundarias de infección (HS) invadiendo intracelularmente. Se observan cavidades (CV) durante el estado necrótico. Barra = 50 μ m. E) Corte transversal de hoja de chícharo a las 96 hdi. Formación de acérvulo en la superficie del hospedante. Presencia de conidióforos (CO) y setas incrustadas (SE). Barra = 20 μ m. F) Corte transversal de hoja sana. Epidermis (E) y mesófilo (M). Barra = 50 μ m.

Figure 3. Microphotographs of the infection process of *C. truncatum* in detached Lincoln pea leaves. A) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 18 hai. First infection hyphae (HI) emerging from appressoria (A). Bar = 10 μ m. B) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 36 hai. Infection hyphae (HI) emerging from appressoria (A), as well as from a lobulated primary hypha (HP) limited by the cell wall (CW) of the host. Bar = 10 μ m. C) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 72 hai. Secondary hyphae (SH) emerging from primary hypha (HP), which penetrate the cell walls (CW) of the host. Bar = 20 μ m. D) Longitudinal cut (paradermal) of a leaf 72 hai. Secondary infection hyphae (HS) invading intracellularly. Cavities (CV) are observed during the necrotrophic state. Bar = 50 μ m. E) Transversal cut of a pea leaf 96 hai. Formation of acervulus on the surface of the host. Presence of conidiophores (CO) and embedded setae (SE). Bar = 20 μ m. F) Transversal cut of a healthy leaf. Epidermis (E) and mesophyll (M). Bar = 50 μ m.

dios (Figura 3E), en contraste con la hoja sana (Figura 3F). El daño celular se asoció con los síntomas de antracnosis (Figura 2C), en contraste con la hoja testigo, la cual no presentó síntomas (Figura 2D). A diferencia del estudio realizado por O'Connell *et al.* (1993), la cepa de *C. truncatum* utilizada en la presente investigación produjo acérvulos en

To the project 2011-163213 "El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador" financed by SAGARPA, to CONACyT for funding the studies for I. Rojo-Báez, and to Dr. Apolinar Santamaría Miranda of the CIIDIR-IPN Sinaloa for her support in performing the histopathological analysis in her laboratory.

~~~~~ End of the English version ~~~~~



chícharo. Los acérvulos con conidios se produjeron a partir de las 96 hdi, concluyendo así el ciclo de vida del patógeno. Los síntomas de antracnosis en hoja de chícharo a las 148 hdi fueron limitados en extensión, en contraste con los observados en papaya, probablemente debido a que la cepa originalmente se aisló de fruto de papaya.

## CONCLUSIÓN

En este estudio se demostró que la cepa CCM de *C. truncatum* se comportó como patógeno intramural subcuticular en papaya y como hemibiótrofo intracelular en chícharo, por lo que el proceso de infección es dependiente del hospedante.

## AGRADECIMIENTOS

Al proyecto 2011-163213 “El manejo integral del cultivo de papaya en México, un acercamiento innovador” financiado por SAGARPA, al CONACyT por el financiamiento a los estudios de I. Rojo-Báez y a la Dra. Apolinar Santamaría Miranda del CIIDIR-IPN Sinaloa por su apoyo para realizar el análisis histopatológico en su laboratorio.

## LITERATURA CITADA

Bhadauria V, Banniza S, Vandenberg A, Selvaraj G and Wei Y. 2011. Cataloging proteins putatively secreted during the biotrophy-necrotrophy transition of the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. *Plant Signaling & Behavior*. 6:1457-1459. Disponible en línea: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/psb.6.10.17700>

Casarrubias-Carrillo U, Cárdenas-Soriano E, Nieto-Ángel D y Gutiérrez-Alonso G. 2002. Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20: 88-93. Disponible en línea: <http://www.socmexfito.org/2013-06-19-02-09-15/001-vol-20/101-revista-smf/2002/001/234-histopatologia-de-frutos-de-papaya-carica-papaya-l-infectados-por-colletotrichum-gloeosporioides-penz>

Diéguez-Uribeondo J, Förster H, Soto-Estrada A and Adaska-veg, JE. 2005. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. *Phytopathology*. 95:751-758. <http://dx.doi.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-95-0751>

Kubo Y, Takano Y, Tsuji G, Horino O and Furusawa I. 2000. Regulation of melanin biosynthesis genes during appressorium formation by *Colletotrichum lagenarium* 99p. Prusky D, Freeman S and Dickman MB. (eds.). *In: Colletotrichum Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. APS press, Minnesota, USA. 399 p.

Latunde-Dada AO and Lucas JA. 2007. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. *Plant Pathology*. 56:437-44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01576.x/epdf>

O'Connell RJ, Uronu AB, Waksman G, Nash C, Keon JPR and Bailey JA. 1993. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. *Plant Pathology*. 42:774-783. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01564.x>

O'Connell RJ, Perfect S, Hughes B, Carzaniga R, Bailey J and Green J. 2000. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. 55-77p. Prusky D, Freeman S and Dickman MB. (eds.). *In: Colletotrichum Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. APS press, Minnesota, USA. 399 p.

Pandey A, Pandey BK, Muthukumar M, Yadava LP and Chauhan UK. 2012. Histopathological study of infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and Sacc. on *Mangifera indica* L. *Plant Pathology Journal*. 11:18-24. <http://dx.doi.org/ppj.2012.18.24&linkid=pdf>

Perfect SE, Hughes HB, O'Connell RJ and Green JR. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*. 27:186-198. <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>

Pring RJ, Nash C, Zakaria M and Bailey JA. 1995. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 46:137-152. <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.1995.1011>

Ranathunge NP, Mongkolporn O, Ford R and Taylor PWJ. 2012. *Colletotrichum truncatum* pathosystem on *Capsicum* spp: infection, colonization and defense mechanisms. *Australasian Plant Pathology*. 41:463-473. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-012-0156-0>

Rodríguez-López ES, Cárdenas-Soriano E, Hernández-Delgado S, Gutiérrez-Diez A y Mayek-Pérez N. 2013. Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 35:898-905. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v27n1/v27n1a7.pdf>

Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Cortes-Velázquez A, Lappe P, Larque-Saavedra A and Pérez-Brito D. 2008. PCR-based detection and characterization of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum*

*capsici* causing anthracnose in papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatán peninsula. Molecular Biotechnology. 40:293-298. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-008-9093-0>  
Torres-Calzada C, Tapia-Tussell R, Higuera-Ciapara I and Pérez-Brito D. 2012. Morphological, pathological and

genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). European Journal of Plant Pathology. 135:67-79. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7>