

First Report of *Colletotrichum* spp. in fruits of allspice (*Pimenta dioica*) in Veracruz, Mexico

Primer reporte del género *Colletotrichum* spp. en frutos de pimienta gorda (*Pimenta dioica*) en Veracruz, México

Aidé Velázquez-Silva, Silvia Edith García-Díaz, Departamento de Ingeniería Forestal, División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México; Leticia Robles-Yerena*, Cristian Nava-Díaz, Daniel Nieto-Ángel, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP. 56230, México. *Autor para correspondencia: pagin03@yahoo.com.mx.

Recibido: 03 de Noviembre, 2017.

Aceptado: 29 de Abril, 2018.

Velázquez-Silva A, García-Díaz SE, Robles-Yerena L, Nava-Díaz C, Nieto-Ángel D. 2018. First Report of *Colletotrichum* spp. in fruits of allspice (*Pimenta dioica*) in Veracruz, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 342-355.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-1

Primera publicación DOI: 05 de Mayo, 2018.

First DOI publication: May 05, 2018.

Resumen. La pimienta gorda se ha visto afectada por antracnosis, enfermedad que ataca frutos provocando manchas marrón-oscuras hundidas, hasta necrosar los frutos. Entre 2015-2016 en el norte de Veracruz se colectaron frutos de pimienta gorda con y sin síntomas de antracnosis, de estos se obtuvieron 13 cultivos monospóricos; posteriormente fueron caracterizados morfológica, patogénica y molecularmente. Para la caracterización morfológica los aislados se sembraron en medio de papa dextrosa agar y descritos mediante 11 variables. Para la caracterización patogénica fueron inoculados en frutos de pimienta gorda de tres localidades,

Abstract. Allspice is being affected by anthracnose, a disease that attacks fruits, causing dark brown-dark spots, until necrosis invades the fruits and causes them to fall. Between 2015 and 2016 in the north of Veracruz, allspice fruits were collected with and without symptoms of anthracnose. Isolates were obtained, for a total of 13 monosporic isolates, which were submitted to morphological, pathogenic and molecular characterization. For the morphological characterization, the isolates were seeded in potato dextrose agar media and described by 11 variables. In the pathogenic characterization, the isolates were inoculated on fruits of three locations, with and without injury prior to inoculation; the controls were inoculated with sterile distilled water. For the molecular characterization, the deoxyribonucleic acid was extracted by the CTAB extraction and purification method. The ITS region was amplified with primers ITS4, ITS5. All isolates were pathogenic in fruits after 11 days of inoculation. Morphological characterization identified two species: *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*. Molecularly, the results of the morphological

con y sin herida previa a la inoculación, los testigos fueron tratados con agua destilada estéril. Se evaluó la incidencia y severidad. Para la caracterización molecular se extrajo el ácido desoxirribonucleico por el método de extracción y purificación CTAB. La región del ITS fue amplificada con los primers ITS4, ITS5. La caracterización morfológica identificó dos especies: *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. Todos los aislados resultaron patogénicos en los frutos después de 11 días de la inoculación. Molecularmente se confirmaron los resultados de la identificación morfológica y de dos especies adicionales: *C. fragariae* y *C. boninense*.

Palabras clave: especia, antracnosis, caracterización morfológica, patogénica y molecular.

La pimienta gorda es una planta utilizada en el arte culinario, es producida en regiones tropicales en la zona costera del Golfo de México. Más de 15 mil toneladas de pimienta gorda por año se producen en municipios de la Sierra del Totonacapan, estas son distribuidas a nivel nacional y a países de la Unión Europea. Actualmente la producción es afectada por hongos que atacan follaje, tallo, flor y principalmente los frutos de esta planta, lo que ha contribuido en la pérdida de la calidad en el producto, por lo que se investigan las causas que ocasionan dicha reducción (Carballo PI. 2016, abril 10).

La antracnosis es una enfermedad que afecta especies vegetales de diferentes familias botánicas de zonas calurosas y húmedas, causada por diferentes especies del género *Colletotrichum*. Los síntomas comunes que este patógeno provoca son: manchas hundidas de color café oscuro, en hojas, tallos, flores o frutos, dando lugar a la muerte de los tejidos (Rivera, 2007).

En agosto del 2014, la M. C. Silvia E. García Díaz (Comunicación personal), realizó un diagnos-

identification and of two additional species were confirmed: *C. fragariae* and *C. boninense*.

Key words: spice, anthracnose, morphological, pathogenic and molecular characterization.

Allspice is a plant used in the culinary arts and it is produced in tropical areas of the coastal areas of the Gulf of Mexico. More than 15 thousand tons of allspice are produced in municipal areas of the Sierra del Totonacapan and distributed nationwide, as well as to countries in the European Union. Its production is currently being affected by fungi that attack leaves, stem, flowers, and mainly the flowers of this plant, which has contributed to the loss in quality of the product, and has lead to investigations on the cause of such reduction (Carballo PI. 2016, abril 10).

Anthrachnose is a disease that affects plant species of different botanical families from hot and humid areas, caused by different species of the genus *Colletotrichum*. The symptoms commonly caused by this pathogen are dark brown concave spots on leaves, stems, flowers or fruits, leading to the death of tissues (Rivera, 2007).

In August of 2014, M. C. Silvia E. García Díaz (personal communication) performed a diagnosis on allspice fruits, stems and leaves with material from the field in Northern Veracruz, and found symptoms of anthracnose; the disease caused losses of 20 to 50% of the production in pre and post harvest. Due to a lack of information on this fungus in the host, this investigation was carried out between 2015 and 2016, in order to detect the presence of the pathogen with certainty. Because of this, the aim of our investigation was to characterize, pathogenically and molecularly, different isolations obtained from allspice fruits (*Pimenta dioica* L. Merrill) with symptoms of anthracnose and determine the causal agent.

tico en frutos, tallos y hojas de pimienta gorda con material procedente de campo de la zona norte de Veracruz, se detectaron síntomas de antracnosis enfermedad que causo pérdidas del 20 hasta el 50% de la producción en pre y postcosecha. Al no contar con información de este hongo en el hospedante se realizó el presente trabajo entre el 2015-2016, para detectar con certeza la presencia del patógeno. Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar morfológica, patogénica y molecularmente diferentes aislados obtenidos de frutos de pimienta gorda (*Pimenta dioica* L. Merrill) con síntomas de antracnosis y determinar el agente causal.

El muestreo y colecta de material vegetal (hojas, tallos y frutos) con síntomas de antracnosis se realizó en tres huertos intercalados de pimienta gorda y cultivos básicos, ubicados al norte de Veracruz (Localidad 1: La Fábrica, Coxquihui (20.177222°/-97.560278°); Localidad 2: Chapultepec, Espinal (20.204444°/-97.545000°) y Localidad 3: Sta. Isabel, Espinal (20.191111°/-97.529722°)). De cada huerto se colectaron tres muestras, una por cada árbol seleccionado en base a la presencia de síntomas, el estado fenológico de los árboles fue etapa de fructificación. El primer experimento se realizó en julio del 2015 y el segundo en agosto de 2016 (época de producción), en el laboratorio de Enfermedades de Postcosecha del Instituto de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. De cada sitio de colecta, se seleccionaron frutos con síntomas de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 1 min, se lavaron con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente estéril. Posteriormente, se colocaron en cámaras húmedas a 25 ± 1 °C por cinco días. Al observar signos del patógeno en la superficie de los frutos, se realizaron preparaciones y se confirmó el hongo de interés. De estos se obtuvieron cultivos monospóricos en medio de cultivo PDA (39 gr en 1L agua) siguiendo la metodología

The sampling and collection of plant material (leaves, stems and fruits) with symptoms of anthracnose was carried out in three orchards alternated with allspice and basic crops, located in Northern Veracruz (Location 1: La Fábrica, Coxquihui (20.177222°/-97.560278°); Location 2: Chapultepec, Espinal (20.204444°/-97.545000°) and Location 3: Sta. Isabel, Espinal (20.191111°/-97.529722°)). Three samples were taken from each orchard, one for each tree chosen, based on the presence of symptoms, and the phenological state of the trees was the stage of fructification. The first experiment was carried out in July of 2015, and the second one, in August of 2016 (production season), in the Postharvest Diseases Laboratory of the Instituto de Fitosanidad-Fitopatología of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. From each collection site, fruits were collected with symptoms of the disease, disinfected with sodium hypochlorite at 1% for 1 min, washed using sterile distilled water, and dried with sterile paper towels. Later, they were placed in humidity chambers at 25 ± 1 °C for five days. After finding signs of the pathogen on the surface of the fruits, preparations were made and the fungus of interest was confirmed. From these, we obtained monospore cultures in a PDA culture medium (39 gr in 1L water), following the dilution and dispersion method (Echandi, 1971). Each monospore culture developed in the culture medium for seven days. For the morphology, discs were taken from those cultures, each 0.5 cm in diameter, four repetitions were planted per isolation in Petri dishes with a PDA medium (Bioxon), they were incubated at 28 °C and their growth was evaluated every 48 h until the pathogen filled the dish. The following macroscopic variables were recorded after 10 days: 1) Growth in diameter; 2) Margin of the colony; 3) Type of mycelia; 4) Color of colony; 5) Concentric growth rings; 6) Sporulated colony. After each isolation, preparations were made to

de dilución y rayado (Echandi, 1971). Cada cultivo monospórico se desarrolló en medio de cultivo durante siete días. Para la morfología se extrajeron discos de 0.5 cm de diámetro de esas colonias y se sembraron cuatro repeticiones por aislado en cajas de Petri con medio PDA (Bioxon), se incubaron a 28 °C y se evaluó el crecimiento cada 48 h hasta que el patógeno llenara la caja. Se registraron las siguientes variables macroscópicas evaluadas a los 10 días: 1) Crecimiento en diámetro; 2) Margen de la colonia; 3) Tipo de micelio; 4) Color de colonia; 5) Anillos concéntricos de crecimiento; 6) Colonia esporulada. Posteriormente de cada aislamiento se realizaron preparaciones para caracterizar a las microvariables. Las variables microscópicas evaluadas fueron: 7) Tipo de conidio; 8) Estado sexual; 9) Color y dimensión de apresorio, para observar estas características se utilizó un microscopio compuesto (Micro Star, American Optical) con objetivo 40x; 10) Dimensiones de 50 conidios por aislado; y 11) Dimensiones de 50 apresorios. Los apresorios se obtuvieron a los cinco días de poner preparaciones de conidios en cámaras húmedas para inducir su formación. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y los datos fueron analizados de dos formas: 1) aplicando un análisis multivariado por clusters para las variables empleadas en la identificación y así obtener un dendograma de agrupamiento de las características morfológicas para conocer las especies involucradas en el desarrollo de síntomas de antracnosis en pimienta gorda; 2) se realizó un análisis de varianza normal donde se compararon diámetros de colonias de seis días. Los análisis matemáticos se realizaron utilizando el paquete de análisis estadístico SAS® System for Windows V9, 2002. La identificación de los aislados de *Colletotrichum* en frutos de pimienta gorda se basó en las variables morfológicas, morfométricas, así también en el agrupamiento obtenido del análisis multivariado comparado con

characterize the microvariables. The microscopic variables evaluated were: 7) Type of conidia; 8) Sexual stage; 9) Color and dimension of appressoria, using a compound microscope (Micro Star, American Optical) with a 40x lens to observe these characteristics; 10) Dimensions of 50 conidia per isolation; and 11) Dimensions of 50 appressoria. The appressoria were obtained after 5 days of preparing conidia in humidity chambers to induce their formation. A total random experimental design was used and the data were analyzed in two ways: 1) applying a multivariate analysis by clusters for the variables used in the identification, thus obtaining a clustering dendrogram of the morphological characteristics to know which species were involved in the development of symptoms of anthracnose in allspice; 2) a normal analysis of variance was carried out, in which the diameters of six day old colonies were compared. Mathematical analyses were carried out using the statistical analysis package SAS® System for Windows V9, 2002. The identification of the *Colletotrichum* isolations in allspice fruits was based on the morphological and morphometric, as well as the clustering obtained from the multivariate analysis compared with the descriptions and keys by (Bailey *et al.*, 1996; Barnett y Hunter, 1998). To verify that the symptoms observed in the fruits gathered in the field were caused by the isolations obtained, Koch's postulates (Agrios, 2002). Healthy fruits were gathered (approximately 300 allspice fruits) and 13 *Colletotrichum* spp. monospore isolations obtained from allspice. In order to increase the inoculant, the isolations were planted in corn meal agar (CMA). Using the developed spores, a mother solution was prepared, and the concentration was determined using a hemocytometer, adjusted to 1×10^6 spores/mL. The fruits were disinfected using sodium hypochlorite (NaClO) at 1% for 1 min and rinsed twice with

las descripciones y claves de (Bailey *et al.*, 1996; Barnett y Hunter, 1998).

Para corroborar que los síntomas observados en los frutos colectados en campo, fueron ocasionados por los aislados obtenidos, se realizaron los postulados de Koch (Agrios, 2002). Se colectaron frutos sanos (aproximadamente 300 frutos de pimienta gorda) en los sitios de muestreo y se utilizaron 13 aislados monospóricos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de pimienta gorda. Para incrementar el inoculo, los aislados fueron sembrados en medio de cultivo harina de Maíz (AHM), con las esporas desarrolladas se preparó una solución madre, la concentración se determinó con un Hematocitómetro y se ajustó a 1×10^6 esporas/mL. Los frutos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% por 1 min y enjuagados dos veces con agua destilada estéril, se dejaron secar durante 15 min; se colocaron en cajas de Petri y estas en cámaras húmedas. La inoculación de los frutos se realizó con la suspensión de esporas; para dos aislados que no presentaron esporulación se utilizaron discos de 0.5 cm de diámetro que contenían micelio. Se colocaron 5 μ L de la suspensión de conidios sobre frutos sin herida (s/h) y con herida (c/h) realizada con una aguja de disección a una profundidad de 1 mm; en los testigos se aplicaron 5 μ L de agua destilada estéril en frutos s/h y c/h, por sitio de muestreo. Las cámaras húmedas fueron selladas e incubadas a 23 ± 1 °C, con luz natural durante 11 días. Para evaluar la patogenicidad se determinó la presencia o ausencia de manchas necróticas circulares o deformes, el porcentaje de incidencia y la severidad del hongo sobre el fruto. La incidencia se evaluó como porcentaje de frutos afectados por el patógeno. Para el análisis se agruparon los datos c/h y s/h por aislado y por localidad, utilizando la siguiente ecuación (1), sugerida por Anculle y Álvarez (1999). La severidad se evaluó como porcentaje de tejido afectado por el patógeno, utilizando la escala visual de Anculle y Alvarez (2006), modificada

sterile distilled water and left to dry for 15 min. They were then placed in Petri dishes that were, in turn, placed in humidity chambers. Fruit inoculation was carried out with the spore suspension; for two isolation that displayed sporulation, we used discs, 0.5 cm in diameter, which contained mycelium. We placed 5 μ L of the conidia suspension on fruits without lesions (w/o/l) and with lesions (w/l), made with a dissection needle, to a depth of 1 mm. In the controls, 5 μ L of distilled water were applied in fruits w/o/l and w/l, per sampling site. The humidity chambers were sealed and incubated at 23 ± 1 °C, with natural light for 11 days. To evaluate the pathogenicity, we determined the presence or absence of circular or deformed necrotic spots, the percentage of incidence, and the severity of the fungus on the fruit. Incidence was evaluated as a percentage of fruits affected by the pathogen. For the analysis, the data of w/o/l and w/l were grouped by isolation and location, using equation (1), suggested by Anculle and Álvarez (1999). Severity was evaluated as the percentage of tissue affected by the pathogen, using the visual scale by Anculle and Alvarez (2006), modified and adapted to the experiment; considering the degree of the condition graded visually in each fruit, it was valued using severity equation 2 according to Anculle and Alvarez (1999).

$$\text{Incidencia (I)} = \left(\frac{\text{No. de frutos enfermos}}{\text{No. total de frutos}} \right) * 100 \quad (1)$$

$$\text{Severidad (S)} = \left(\frac{\text{No. de frutos en cada grado}}{\text{No. total de frutos}} \right) * 100 \quad (2)$$

The treatments were a combination of isolations, inoculation and host method, established under a

y adaptada al experimento; teniendo en cuenta el grado de afección calificado visualmente en cada fruto, fue valorada con la ecuación 2 de severidad según Anculle y Alvarez (1999).

$$\text{Incidencia (I)} = \left(\frac{\text{No. de frutos enfermos}}{\text{No. total de frutos}} \right) * 100 \quad (1)$$

$$\text{Severidad (S)} = \left(\frac{\text{No. de frutos en cada grado}}{\text{No. total de frutos}} \right) * 100 \quad (2)$$

Los tratamientos fueron una combinación de aislado, método de inoculación y hospedante, establecido bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones inoculados con herida (c/h) y cinco sin herida (s/h) comparando el grado del daño sobre el fruto, el aislado y el sitio de muestreo para la variable severidad; para la variable incidencia se utilizó un análisis multivariado comparando el número de frutos dañados c/h y s/h, los aislados y la incidencia en los tres sitios de muestreo. Los análisis matemáticos se llevaron a cabo usando el paquete de análisis estadístico SAS® System for Windows V9, 2002. Para la confirmación de los postulados de Koch, se reaisló el patógeno extrayendo fragmentos de tejido y/o esporulación, que fueron depositados en PDA, se observaron y compararon las variables macro y microscópicas de los reaislados con las que presentaron los originales de los frutos de pimienta gorda. El experimento se repitió dos veces.

Cultivos monospóricos de los 13 aislamientos fueron incubados por 10 días a temperatura ambiente 23 ± 1 °C en medio de cultivo PDA. De cada aislado se tomó una muestra de micelio, se depositó en un tubo Eppendorf para ser macerado.

total random design with five repetitions inoculated with a lesion (w/w) and five without a lesion (w/o/l), comparing the degree of damage on the fruit, the isolation and the sampling site for the variable of severity; for the variable of incidence, we used a multivariate analysis comparing the number of damaged fruits w/l and w/o/l, the isolations and the incidence on the three sampling sites. Mathematical analyses were performed using the statistical analysis package SAS® System for Windows V9, 2002. To confirm Koch's postulates, we reisolated the pathogen, extracting fragments of tissue and/or sporulation, which were deposited in PDA, observed and we compared the macro and microscopic variables of the reisolations with which the original allspice fruits were presented. The experiment was carried out twice.

Monospore cultures from all 13 isolations were incubated for 10 days at a room temperature of 23 ± 1 °C in a PDA culture medium. A sample of mycelium was taken from each isolation and deposited into an Eppendorf tube to be macerated. DNA was extracted with the CTAB extraction and purification method (Wagner et al., 1987). Later, DNA concentration was quantified using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). We completely amplified genes ITS-1, ITS-2 and 5.8S, and partially, gene 18S and 28S of the 13 *Colletotrichum* spp. isolations; primers ITS 5 and ITS 4 were used. The PCR amplification and sequencing (ITS) of the DNA extracted were carried out using the Sanger method in the company Macrogen (Korea). The sequences of the 13 isolations were compared with those deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), with the support of the Blast tool. The sequences with the greatest similarities were extracted from the data bank for phylogenetic analyses and then, along with those obtained from the fruits, they were aligned (Clustal W)

La extracción de ADN se realizó por el método de extracción y purificación CTAB (Wagner *et al.*, 1987). Posteriormente de cada muestra se cuantifico la concentración de ADN mediante un Nano-Drop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Se amplificaron completamente los genes ITS-1, ITS-2 y 5.8S; y parcialmente al gen 18S y 28S de los 13 aislados de *Colletotrichum* spp.; se utilizaron los primers ITS 5 e ITS 4. La amplificación PCR y la secuenciación (ITS) del ADN extraído se llevó a cabo con el método de Sanger en la empresa Macrogen (Korea). Las secuencias de los 13 aislados fueron comparadas con las depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), con apoyo de la herramienta Blast. Las secuencias de mayor similitud fueron extraídas del banco de datos para los análisis filogenéticos y posteriormente junto con las obtenidas de los frutos fueron alineadas (Clustal W) y después procesadas mediante el método UPGMA en el programa Mega 6 (Análisis de Genética Evolutiva Molecular), para la obtención de un análisis filogenético.

Se obtuvieron 13 cultivos monospóricos de *Colletotrichum* spp. de los cuales se identificaron cuatro especies aislados de frutos de pimienta gorda con síntomas de antracnosis (Figura 1). El crecimiento en diámetro fue similar para la mayoría de los aislados, excepto para tres con crecimiento lento, identificados como *C. acutatum*. El 69% de las colonias presentaron un crecimiento y margen circular, mientras que el 31% un crecimiento circular y un margen ondulado, pero la mayoría presentó anillos concéntricos. Andrades *et al.* (2009) y Chowdappa *et al.* (2012), describieron colonias con márgenes regulares y un crecimiento circular; Morales *et al.* (2009) y Saldarriaga *et al.* (2008), observaron formación de anillos de crecimiento en algunos de sus aislados. Por otra parte, el 15% de los aislados presentó un micelio aéreo y el 54% fue plano; el 8% micelio denso y el 23% fue escaso;

and processed using the UPGMA method in the program Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), to obtain a phylogenetic analysis.

Thirteen *Colletotrichum* spp. monospore cultures were obtained, out of which four isolated allspice fruit species were identified as presenting symptoms of anthracnosis (Figure 1). The growth in diameter was similar for most isolations, except for three with a slow growth, identified as *C. acutatum*. Out of all the cultures, 69% presented a circular growth and edge, while 31% presented a circular growth and a wavy edge, although most presented concentric rings. Andrades *et al.* (2009) and Chowdappa *et al.* (2012), described cultures with regular edges and a circular growth; Morales *et al.* (2009) and Saldarriaga *et al.* (2008), observed a formation of growth rings in some of their isolations. On the other hand, 15% of the isolations presented aerial mycelia and 54% was flat; 8% presented a dense mycelium and in 23%, it was scarce fue escaso. Similar results were presented by Saldarriaga *et al.* (2008), since 70% of their strains presented a thin, superficial growth, mycelial aggregates. The color of the culture was initially white-salmon, and later turned dark gray; 54% had a salmon-white-gray, 31% was white-gray, 8% was salmon and 7% were white cultures; similar percentages were reported by Dominguez *et al.* (2012). On the other hand, Freeman *et al.* (1998), report that *C. acutatum* developed salmon-colored conidial masses, and *C. gloeosporioides*, a gray sporulation. Out of the isolations, 77% produced unicellular hyaline conidia with rounded edges and only 23% presented conidia with one rounded edge, and another acute edge; Villanueva *et al.* (2008), reported the formation of hyaline, aceptados, cyllindrical and straight. Robles (2015) mentioned that 83% of his isolations developed unicellular, hyaline conidia with rounded edges, 11% presented conidia with one rounded edge and another acute

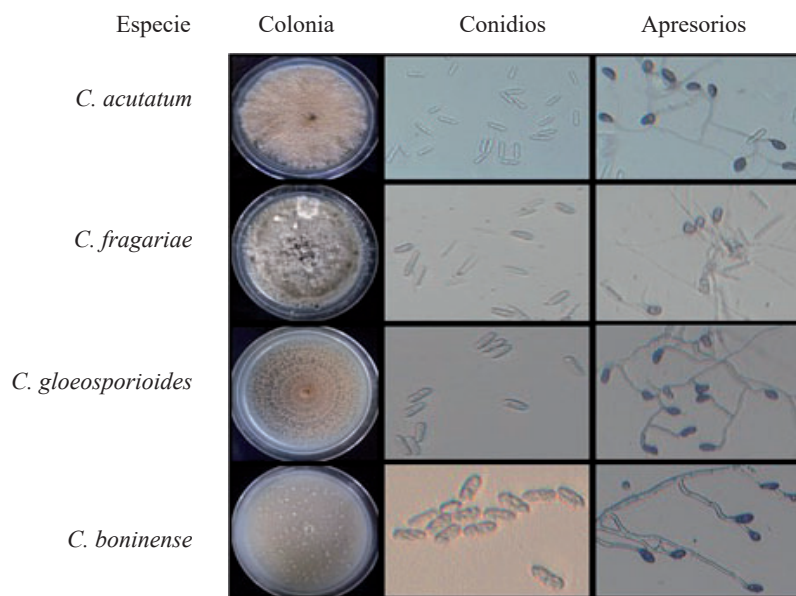


Figura 1. Características macroscópicas y algunas microscópicas de las especies de *Colletotrichum* spp., obtenidos de frutos de pimienta gorda en el norte de Veracruz.

Figure 1. Macroscopic and some microscopic characteristics of the *Colletotrichum* spp. species obtained from allspice fruits in Northern Veracruz.

resultados parecidos fueron reportados por Saldarriaga *et al.* (2008) el 70% de sus cepas presento crecimiento ralo superficial, agregados miceliales. El color de colonia inicialmente fue blanca-salmón, posteriormente se tornó gris oscuro; el 54% presentó una coloración salmón-blanco-gris, el 31% blanco-gris, el 8% salmón y el 7% colonias blancas, porcentajes similares fueron reportados por Dominguez *et al.* (2012). Por su parte, Freeman *et al.* (1998), reportan que *C. acutatum* desarrollo masas conidiales de color salmón y *C. gloeosporioides* una esporulación grisácea. El 77% de los aislados produjo conidios unicelulares, hialinos, con extremos redondeados y solo el 23% presentó conidios con un extremo redondeado y el otro agudo; Villanueva *et al.* (2008), reportaron la formación de conidios hialinos, aceptados, cilíndricos y rectos. Robles (2015), mencionó que el 83% de sus aislados desarrollaron conidios unicelulares, hialinos, con extremos redondeados, el 11% presentó conidios

edge, and 6% of conidia with both ends being acute. Villanueva *et al.* (2008), reported that the *C. gloeosporioides* conidia presented obtuse ends, but some are narrow, and *C. Fragariae*, and obtuse end and another narrow end. The length and width of the conidia ranged between 18.1 - 44.9 μm and 4.2 - 13.6 μm , respectively; the total average for the size of conidia was 28.4 x 8.4 μm . Statistically, no significant differences were found in the length and width ($\text{Pr}>\text{F}$: <0.0001; α : 0.05; LSD length and width of conidium: 1.2891 and 0.4377). Similar results were reported by Villanueva *et al.* (2008). Irregular appressoria were observed, with different shapes, and with a dark brown color. Length ranged between 9.2 and 90.2 μm , while the width ranged between 5.9 and 57.1 μm ; the average was 25.9 x 15.5 μm ; statistically, no significant differences were found in length ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0014, α : 0.05, LSD: 6.0527) and width ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0001, α : 0.05, LSD: 3.4877). Robles (2015) and Oliveira *et al.* (2005)

con un extremo redondeado y el otro agudo y el 6% conidios con ambos extremos agudos. Villanueva *et al.* (2008), reportó que los conidios de *C. gloeosporioides* presentaron extremos obtusos pero algunos angostos y en *C. fragariae* un extremo obtuso y otro angosto. La longitud y ancho de los conidios osciló entre 18.1 - 44.9 μm y 4.2 - 13.6 μm , respectivamente; el promedio total en tamaño de conidios fue de 28.4 x 8.4 μm ; estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en la longitud y ancho ($\text{Pr}>\text{F}$: <0.0001; α : 0.05; LSD largo y ancho de conidio: 1.2891 y 0.4377). Resultados similares fueron reportados por Villanueva *et al.* (2008). Se observaron apresorios irregulares, de formas diferentes, de color café oscuro; la longitud osciló de 9.2 - 90.2 μm mientras el ancho de 5.9 - 57.1 μm ; el promedio fue de 25.9 x 15.5 μm ; estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en la longitud ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0014, α : 0.05, LSD: 6.0527) y ancho ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0001, α : 0.05, LSD: 3.4877). Robles (2015) y Oliveira *et al.* (2005) reportaron resultados similares a los obtenidos en este experimento; Villanueva *et al.* (2008), observaron que los apresorios formados por *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. orbiculare* fueron de color café, forma y tamaño similar; *C. boninense* promueve apresorios solitarios o en cadenas cortas, color marrón, de paredes gruesas, borde entero o crenado, rara vez lobulados, de forma irregular comúnmente en forma de proyectil de 4.5-18 x 4-11 μm de acuerdo a Damm *et al.* (2012). Solo un aislado presentó ascas con ascosporas hialinas, ligeramente curvadas y con los vértices redondeados; los demás sin presencia; Robles (2015), reporta una escasa formación de peritecios en medio de cultivo PDA. Con los datos obtenidos de las 11 características macroscópicas y microscópicas se realizó un análisis multivariado; se encontró un eigenvalue de 2.07 a los cuatro clusters o grupos. Esta información se confirmó con el valor de la Pseudo F que alcanzó un punto máximo de 21.9 a los cuatro grupos o clusters. Con estos

reported similar results to those obtained in this experiment; Villanueva *et al.* (2008), observed that the appressoria formed by *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. orbiculare* were dark brown, and with similar shapes and sizes; *C. boninense* promotes appressoria in short chains or solitary, brown-colored, with thick walls, whole or crenate edges, rarely lobulated, with irregular shapes, but commonly in the shape of a projectile 4.5-18 x 4-11 μm according to Damm *et al.* (2012). Only one isolation presented asci with hyaline ascospores, slightly curves and with rounded vertices, and the rest had no presence. Robles (2015), reports a scarce formation of perithecia in a PDA culture medium. A multivariate analysis was carried out using data obtained from the 11 macroscopic and microscopic characteristics, and an eigenvalue of 2.07 was found for the four clusters or groups. This information was confirmed using the value of the Pseudo F that peaked at 21.9 for the four clusters or groups. These values affirm that when analyzing the groups alongside the evaluated, the 13 isolations can be classified into four groups.

The aggressiveness of the isolations was variable in the form of inoculation (w/l and w/o /l), type of inoculation (suspension and section of growth media) and between isolations; these differences helped prove that some isolations are capable of inducing more aggressiveness than others, regardless of the condition of the inoculation. Some allspice fruits presented brown, circular necrotic spots on the epidermis of the fruit, concave, moist and soft lesions. As the infection progressed, the spots turned brownish-maroon to dark; salmon-colored, pink to orange sporulation appeared on the lesions, and in some cases, white mycelia formed from the initial lesion, until it covered the fruits. These results coincide with those reported by Somashekhara *et al.* (2013).

Incidence percentages obtained ranged from 20 to 100% from *Colletotrichum* spp. on the total

valores se asevera que al analizar paralelamente las variables evaluadas, los 13 aislados se pueden clasificar en cuatro grupos.

La agresividad de los aislados fue variable en forma de inoculación (c/h y s/h), tipo de inoculación (suspensión y bocado) y entre los aislados; estas diferencias permitieron probar que algunos aislados son capaces de inducir más agresividad que otros, independientemente de la condición de inoculación. Se observaron frutos de pimienta gorda con manchas necróticas circulares de color café sobre la epidermis del fruto, lesiones hundidas, húmedas y blandas; conforme la infección avanzó, las manchas se tornaron marrón-café a oscuras, sobre las lesiones se presentó esporulación de color salmón, rosa a naranja y en algunos casos se desarrolló micelio blanco que cubrió los frutos a partir de la lesión inicial; Estos resultados coinciden con lo reportado por Somashekhara *et al.* (2013).

Se obtuvieron porcentajes de incidencia desde 20 a 100% por *Colletotrichum* spp. sobre la totalidad de frutos; se observó mayor incidencia en frutos de la localidad 2 y esta fue menor en proporción en aquellos procedentes de la localidad 1. Bogantes y Mora (2013), reportaron una alta incidencia (70%), pero baja severidad en frutos, de papaya. En el análisis multivariado se encontró un eigenvalue de 6.32 a los 2 clusters o grupos. Esta información se confirmó al revisar el valor de la Pseudo F que alcanzó un punto máximo de 20.9 a los dos grupos mayores o clusters. Por su parte, los resultados de la evaluación de severidad mostraron que esta fue mayor en frutos de pimienta gorda de la localidad 2, y en menor proporción en las localidades 1 y 3 ($Pr > F: <.0001, \alpha: 0.05, LSD: 6.9888$; diferencia en medias de: 35.644 A en la localidad 2 contra 5.604 B en la localidad 1) (Figura 2), así también se obtuvieron porcentajes de severidad altos en las inoculaciones, y se observó un nulo porcentaje en inoculaciones con agua ($Pr > F: <.0001, \alpha: 0.05$;

amount of fruits. A higher incidence was observed in fruits from location 2, which was lower than in location 1. Bogantes and Mora (2013) reported a high incidence (70%) but low severity in papaya fruits. The multivariate analysis found an eigenvalue of 6.32 in two clusters or groups. This information was confirmed when reviewing the value of Pseudo F that reached a maximum point of 20.9 for the two highest clusters or groups. On the other hand, the results of the severity evaluation showed that it was higher in allspice fruits from location 2, and to a lesser extent, in locations 1 and 3 ($Pr > F: <.0001, \alpha: 0.05, LSD: 6.9888$; difference in averages of 35.644 A in location 2 against 5.604 B in location 1) (Figure 2). In this way, high percentages for severity were also obtained in inoculations, and a null percentage was observed in inoculations with water ($Pr > F: <.0001, \alpha: 0.05$; LSD: 13.778; difference in averages of 16.773 A for suspension against 0.000 B in inoculation with water). The severity of each isolation in fruits from location 2 was of 100% ($Pr > F: 0.0094, \alpha: 0.05$ y LSD: 20.636), invading the fruits completely, with abundant sporulation, and in some, white to gray mycelia developed. Similar results were obtained by Bogantes and Mora (2013), obtaining a percentage of 100% for papaya fruits affected by anthracnose, with an average of 36% for severity in fruits.

The reisolations obtained from the inoculated fruits displayed symptoms and signs with similar macro and micro morphological characteristics to those of the original isolations, complying with Koch's 4^o postulate in a satisfactory manner.

The ITS region of the thirteen isolations obtained from allspice fruits was amplified, and this helped compare and determine the fungus species. The results obtained from the GenBank with the Blast tool of the amplified sequences revealed that the 13 existing isolations were divided into four



Figura 2. Aislados de *Colletotrichum* spp. que causan el mayor grado de severidad en frutos de pimienta gorda.
Figure 2. *Colletotrichum* spp. isolations that cause the highest degree of severity in allspice fruits.

LSD: 13.778; diferencia en medias de: 16.773 A por suspensión contra 0.000 B en inoculación con agua). La severidad de cada aislado en frutos de la localidad 2 fue del 100% ($Pr > F$: 0.0094, α : 0.05 y LSD: 20.636), invadiendo completamente a los frutos, abundante esporulación y en algunos se desarrolló micelio de color blanco a gris. Resultados similares fueron reportados por Bogantes y Mora (2013), obteniendo un 100% de frutos de papaya afectados por antracnosis con un promedio de 36% de severidad en fruta.

Los reaislamientos que se obtuvieron de los frutos inoculados, presentaron síntomas y signos con características macro y micro morfológicas iguales a las de los aislados originales, con lo que se cumplió satisfactoriamente el 4° postulado de Koch.

La región ITS de los trece aislados obtenidos de frutos de pimienta gorda, fue amplificada permitiendo comparar y determinar las especies de hongos; los resultados obtenidos del GenBank mediante la herramienta Blast de las secuencias amplificadas de los iniciadores, revelaron que los 13 aislados existentes se dividieron en cuatro especies del género *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* y *C. boninense*. Con las

species of the genus *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides* and *C. boninense*. Using the sequences, we created a phylogenetic tree (Figure 3), which shows the clustering of associates species. According to the similar characteristics of the isolations, three groups can be distinguished: the group with the highest number of isolations is composed of the species *C. gloeosporioides*, and within this set with analogous characteristics is *C. fragariae*; the second group differs by a lower proportion of the largest set and includes the species *C. boninense*; and the last group that desynchronizes molecularly and morphologically from the other isolations includes the species *C. acutatum*.

The use of molecular techniques for this investigation was of great importance, since the species belonging to this genus show a great genetic variability, which is expressed in morphological variability, virulence, and aggressiveness (Freeman *et al.*, 2000).

Thirteen monospore isolations were obtained from *Colletotrichum* spp., from allspice fruits taken from three locations. Using morphological characterizations, we identified *C. acutatum* (23%),

secuencias se obtuvo un árbol filogenético (Figura 3), en el que se observa el agrupamiento de las especies asociadas, según las características similares de los aislados, se diferencian tres grupos: el grupo con mayor número de aislados lo conforma la especie *C. gloeosporioides*, dentro de este conjunto con características análogas se encuentra *C. fragariae*; el segundo grupo difiere en menor proporción del conjunto mayor y ubica a la especie *C. boninense*; y el último grupo que se desfasa molecular y morfológicamente de los demás aislados coloca a la especie *C. acutatum*.

La utilidad de las técnicas moleculares para esta investigación fue de considerable importancia ya que las especies pertenecientes a este género muestran una gran variabilidad genética, que se expresa en variabilidad morfológica, virulencia y agresividad (Freeman *et al.*, 2000).

Se obtuvieron 13 aislados monospóricos de *Colletotrichum* spp., de frutos de pimienta gorda provenientes de tres localidades productoras. Con

a species of slow growth, with rounded and sharp edges, and *C. gloeosporioides* (77%), a pathogen of fast growth, with conidia with rounded edges; the variable of sexual state of phase was found in an isolation. In pathogenic characterization, we found a variation in the aggressiveness between *Colletotrichum* isolations on allspice fruits, finding a higher number of aggressive isolations in fruits in the location of Chapultepec, Espinal, Ver., which helped affirm that, at least for this investigation, pathogenicity does depend in the location from which the isolation is taken. Out of the two methods of inoculation (w/l and w/o/l), the best results were obtained using the method w/l, which showed a higher incidence and severity of *Colletotrichum* in the fruits; controls displayed no symptoms. Molecular identification confirmed the results of morphological characterization and showed the presence of two additional species, therefore, out of the 13 isolations, three belonged to *C. acutatum*, one belonged to the species *C. fragariae*, eight

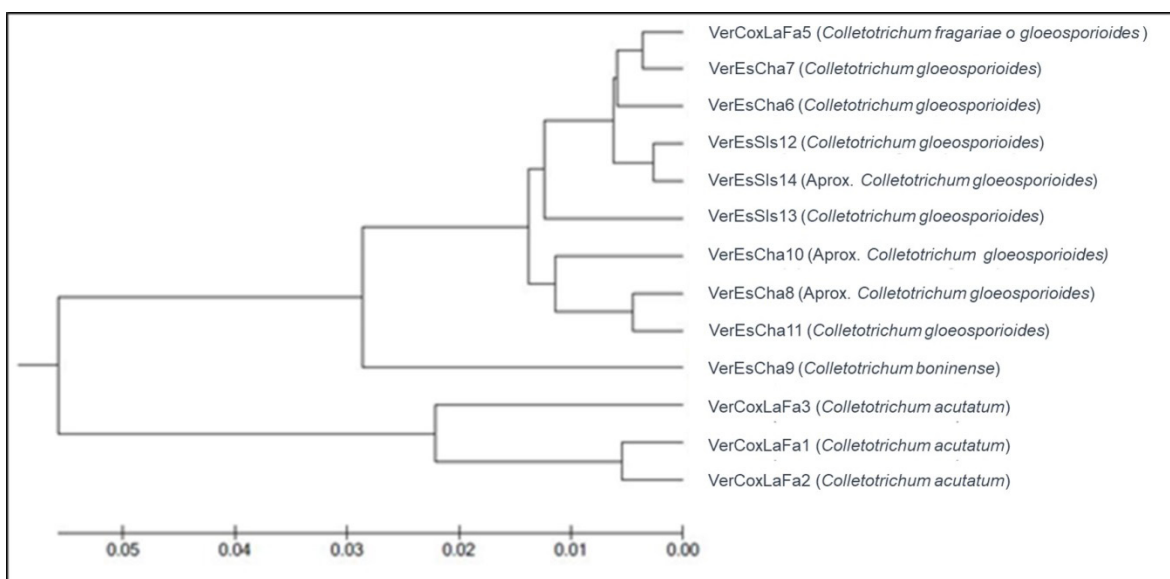


Figura 3. Árbol filogenético de los 13 aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de pimienta gorda en el norte de Veracruz.

Figure 3. Phylogenetic tree for the 13 *Colletotrichum* spp. isolations obtained from allspice fruits in Northern Veracruz.

la caracterización morfológica se identificó a *C. acutatum* (23%), especie con crecimiento lento, conidios con extremo redondeado y agudo; y *C. gloeosporioides* (77%), patógeno con crecimiento rápido, conidios con extremos redondeados; la variable estado o fase sexual se encontró en un aislado. En la caracterización patogénica se encontró variación en agresividad entre los aislados de *Colletotrichum* sobre los frutos de pimienta gorda, encontrando mayor número de aislados agresivos en frutos pertenecientes a la localidad Chapultepec, Espinal, Ver., lo que permitió aseverar que al menos para esta investigación, la patogenicidad sí depende de la localidad de donde se obtenga el aislado. De los dos métodos de inoculación (c/h y s/h) los mejores resultados se obtuvieron con el método c/h, que mostraron mayor incidencia y severidad de *Colletotrichum* en los frutos, en los testigos no se observó ningún síntoma. La identificación molecular confirmó los resultados de la caracterización morfológica y evidenció la presencia de dos especies adicionales, por lo cual de los 13 aislados: tres aislados correspondieron a *C. acutatum*; uno a la especie *C. fragariae*; ocho a la especie *C. gloeosporioides* y uno como *C. boninense*. Los resultados moleculares obtenidos coincidieron con un alto porcentaje de similitud (97 a 99%) con las especies reportadas en el GenBank, de otros hospederos.

LITERATURA CITADA

- Agrios GN. 2002. Fitopatología. Second Edition. Limusa. México. 837p.
- Anculle A y Álvarez R. 1999. Evaluación de enfermedades de plantas. Estudio Arequipa, Perú. Disponible en línea: <https://es.scribd.com/document/151857253/Evaluacion-de-Enfermedades-de-Las-Plantas>
- Anculle A y Álvarez R. 2006. Evaluación de enfermedades de plantas. Arequipa, Perú: Senasa. Disponible en línea: <http://www.bioline.org.br/pdf?cg09021>
- Andrades I, Yender F and Labarc J. 2009. Evaluation of anthracnose (*Colletotrichum* sp) in *Annona muricata* L. Giant type in the sector Moralito, Zulia State, Venezuela. Revista UDO Agrícola 9:148-157. Disponible en línea: <http://udoagricola.orgfree.com/V9N1UDOAg/V9N1Andrades148.htm>
- Bailey JA, Nash C, Morgan LW, O'Connell RJ and TeBeest DO. 1996. Molecular Taxonomy of *Colletotrichum* species causing Anthracnose on the Malvaceae. Phytopathology 86:1076-1083. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-86-1076>
- Barnett H. and Hunter B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. APS Press. Minnesota, USA. 197p.
- Bogantes A y Mora N. 2013. Incidencia y Severidad de la Anthracnosis en líneas e híbridos de papaya (*Carica papaya*). Agronomía Mesoamericana 24:411-417. Disponible en línea: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S165913212013000200017&script=sci_arttext&tlng=en#Corres1
- Carballo PI. 2016. Apoya IPN a productores de pimienta de Papantla. El Diario Martinense. Disponible en línea: <http://diarioelmartinense.com.mx/estado/regional/36165-apoya-ipn-a-productores-de-pimienta-de-papantla.html>
- Chowdappa P, Somashekar C, Bharghavi R, Sandhya H and Prasad P. 2012. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. Isolates causing anthracnose of orchids in India. Biotechnology Bioinformatics Bioengineering 2:567-572. Disponible en línea: <http://bioscipub.com/journals/bbb/pdf/567-572.pdf>
- Damm U, Cannon PF, Woudenberg JHC, Johnston PR, Weir BS, Tan YP and Crous PW. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. Studies in Mycology 73:1-36. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0002>
- Dominguez GI, Mohali CSR, Marin MMA y Pino MHB. 2012. Caracterización y variabilidad genética de *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato en plantaciones de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Venezuela. Tropical Plant Pathology 37:108-122. Disponible en línea: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1982-56762012000200003&script=sci_abstract&tlng=es
- Echandi E. 1967. Obtención de cultivos monospóricos por los métodos de dilución y rayado. Pág. 16. In: Echandi E (eds.). Manual de laboratorio para Fitopatología General. Turrialva. 51p. Disponible en línea: <https://books.google.com.mx/books?id=9I0gAQAIAAJ&pg=PA16&lpg=PA16&dq=Obtenci%C3%B3n+de+cultivos+monosp%C3%B3ricos+por+los+m%C3%A9todos+de+diluci%C3%B3n+y+rayado&source=bl&ots=Q0FKvqrC7w&sig=5BjxvuFLWKYUuvmpl6aOXSnStb4&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi6opKeoMPTAhWC>

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



- Freeman S, Katan T and Shabi E. 1998. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82:596-604. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.596>
- Freeman S, Minz D, Jurkevitch E, Maymos M and Shabi E. 2000. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology* 90:608-614. <http://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.6.608>
- Morales GJL, Azpiroz RHS y Pedraza SME. 2009. Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Causante de la antracnosis en aguacate (*Persea americana* Mill) en Michoacán, México. *Revista UDO Agrícola* 9:848-856. Disponible en línea: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3394147>
- Oliveira R, Moral J, Bouhmid K. y Trapero A. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la antracnosis del olivo. *Boletín de sanidad vegetal* 31:531-548. Disponible en línea: <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/2420>
- Rivera G. 2007. Conceptos Introductorios a la Fitopatología (1 ed.). EUNED, ed.) Costa Rica. Disponible en línea: [https://books.google.com/books?id=xpTHXEWG\\_t8C&pg=PA6&lpg=PA6&dq=Conceptos+Introductorios+a+la+Fitopatolog%C3%ADa&source=bl&ots=OQNO\\_7ozWd&sig=SjX\\_YMlwt5cJucIh8oKsQBURa34&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjlgfiAh7rLAhXq74MKHb8mBkQQ6AEIITAB#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com/books?id=xpTHXEWG_t8C&pg=PA6&lpg=PA6&dq=Conceptos+Introductorios+a+la+Fitopatolog%C3%ADa&source=bl&ots=OQNO_7ozWd&sig=SjX_YMlwt5cJucIh8oKsQBURa34&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjlgfiAh7rLAhXq74MKHb8mBkQQ6AEIITAB#v=onepage&q&f=false)
- Robles L. 2015. Caracterización morfológica, molecular, patogenicidad cruzada y Resistencia a productos químicos en aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de aguacate a nivel nacional. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos. Fitosanidad-Fitopatología, Texcoco de Mora, Edo. México. Tesis Doctoral. Pp. 167.
- Saldarriaga CA, Castaño Z y Arango I. 2008. Caracterización del agente causante de la antracnosis en tomate de árbol manzano y mora. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 32:145-156. Disponible en línea: [https://www.researchgate.net/publication/257652278\\_Caracterizacion\\_del\\_Agente\\_Causal\\_de\\_la\\_Antracnosis\\_en\\_Tomate\\_de\\_Arbol\\_Manzano\\_y\\_Mora](https://www.researchgate.net/publication/257652278_Caracterizacion_del_Agente_Causal_de_la_Antracnosis_en_Tomate_de_Arbol_Manzano_y_Mora)
- Somashekhara A, Vasanthakumari M, Mahishi P, Mallikarjunaswamy G and Shivanna M. 2013. Prevalence and Severity of Anthracnose of Yam (*Dioscorea alata* and *D. bulbifera*) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Bhadra Wildlife Sanctuary in Karnataka. *Journal Mycology Plant Pathology* 43:282-290. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/256838587>
- Villanueva A, Yañez MJ y Hernandez AM, 2008. Especies de *Colletotrichum* en Chirimolla (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia* 42:689-701. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952008000600009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000600009)
- Wagner D, Furnier G, Saghay-Marroof M, Williams S, Dancik B and Allard R. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* (pp. 2097-2100). Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC304592/>