

Caracterización morfológica y bioquímica de aislamientos de *Colletotrichum* spp y su patogenicidad en mango (*Mangifera indica* L.)

Carlos Muñoz ¹

Luis Gómez ²

Gerardina Umaña ³

Palabras clave

Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), clasificación morfológica, patogenicidad, electroforesis, mango.

Resumen

Se clasificó el agente causal de la antracnosis mediante la descripción morfológica (tamaño y forma de la espora, color de la colonia y tamaño del micelio), la reacción de patogenicidad en mango (variedad Haden amarilla) siguiendo los postulados de Koch y mediante el empleo de electroforesis de isoenzimas utilizando el sistema esterasa con a y b en naftilacetato como sustrato. Se utilizaron cultivos

monospóricos en PDA de nueve hospedantes de la enfermedad: mango, aguacate, café, papaya, cítricos, culantro, gerbera, banano dedo y corona.

El tamaño de la espora de *C. gloeosporioides* varió entre hospedero en un ámbito de 16,80 a 25,25µm de largo en gerbera y mango, respectivamente, y entre 9,80 a 20,0µm en el ancho en aguacate y cítricos. Se consideró que los descriptores morfológicos no son muy funcionales para separar especies diferentes. La prueba de patogenicidad se consideró adecuada para separar razas del hongo más virulentas o “patovares” de aquellas atenuadas o menos virulentas. El aislamiento de mango produjo el mayor

1 Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía.

2 Universidad de Costa Rica, CIA.

3 Universidad de Costa Rica, Postcosecha.

porcentaje de daño en el fruto (100%), seguido del de gerbera (90%); el aislamiento de culantro no produjo síntomas de la enfermedad en el fruto de mango.

Se obtuvo un patrón enzimático para cada aislamiento, lo que permite su identificación. En el caso de los aislamientos de banano (dedo y corona) los patrones electroforéticos fueron diferentes, lo que indica la especialización del patógeno según el órgano afectado.

Introducción

El cultivo de mango en Costa Rica ocupa un lugar importante dentro de los cultivos no tradicionales de exportación, destinados especialmente a Europa. Se producen aproximadamente unas 400.000 cajas, con un peso promedio de 4,5 kg; el rendimiento total del país es de 19.259tm. con un promedio de 4tm./ha/año (Benavides 1995).

La producción nacional se ve afectada por la incidencia de la antracnosis (*C. gloeosporioides*), patógeno que ataca al cultivo provocando daños en el fruto de hasta el 100% en la mayoría de las plantaciones comerciales (Aráuz 1995). Esta enfermedad ataca a un ámbito muy amplio de hospedantes, entre ellos el café, el aguacate, los cítricos, la papaya, el banano, etc. La enfermedad ataca el follaje, los tallos y las flores. Los síntomas típicos son manchas grandes o pequeñas de colores oscuros con lesiones ligeramente hundidas (Agris 1988; González 1979).

El *Colletotrichum* es un patógeno muy complejo en su clasificación, debido a su variabilidad genética. Los aislamientos del hongo son conocidos por la gran variabilidad en la morfología; preferencia de hospedero; patogenicidad y fisiología, caracteres que complican su taxonomía (Brooker

et al., 1991). Este género incluye cerca de 500 especies. Von Arx, citado por Bonde *et al.*, (1991), distinguió 594 nombres sinónimos de *C. gloeosporioides*. Dentro de este grupo hay varias formas patogénicas, basadas en la especificidad del hospedero.

Esta complejidad determina la necesidad de conocer los diferentes tipos o razas patogénicas (patovares), para determinar las estrategias de combate.

Es importante, además, conocer el hongo a nivel morfológico y bioquímico, para mejorar su manejo fitosanitario. Conocer el ámbito de hospederos es importante para el manejo de la enfermedad.

Este trabajo tuvo como objetivos:

1. caracterizar morfológica y bioquímica aislamientos de antracnosis provenientes de diferentes hospedantes y determinar su patogenicidad en el mango;
2. estudiar la patogenicidad de los aislamientos del hongo;
3. seleccionar aislamientos atenuados del patógeno;
4. hacer una descripción morfológica de cada uno de los aislamientos para su clasificación;
5. establecer patrones isoenzimáticos para cada uno y evaluar su uso en su diferenciación.

Materiales y métodos

Se hicieron aislamientos monospóricos de nueve hospederos de antracnosis: mango, papaya, aguacate, café, cítricos, culantro, gerbera y banano (dedo y corona) en Agar-agua (AA). Del cultivo puro se tomó una alícuota de 0,5cc y se vertió en una caja Petri; se dejó a temperatura ambiente durante 3-4 horas, por un período de 4-5 días en refrigeración y en absoluta oscuridad.

Luego se extrajeron las monósporas bajo el microscopio y se pasaron a cajas Petri con PDA. Las monósporas se dejaron a temperatura ambiente (22°C promedio), para su desarrollo y posterior multiplicación.

Una vez multiplicadas las monósporas de cada uno de los aislamientos, se preparó una dilución de 50.000 esporas/cc. Los frutos de mango var. Haden amarilla, se sumergieron en baño maría por 3 minutos y a 53°C de temperatura; luego se marcaron y cercaron con parafina, cuatro puntos en cada uno, dejando un espacio para depositar las diluciones esporicas; los círculos se identificaron con letras CH₁ y CH₂ (con herida 1 y 2) y SH₁ y SH₂ (sin herida 1 y 2), con el fin de favorecer la penetración del hongo al momento de la inoculación. Se tomaron 10 frutos por hospedero (siete como tratamiento y tres como testigo).

Para la inoculación se utilizó una jeringa con 0,5cc de la concentración de esporas; en los testigos se utilizó la misma dosis de agua destilada. Para una mayor adhesión de las esporas al fruto, se le agregó una gota de Tween 80 a cada tratamiento.

Los frutos inoculados se depositaron en cajas de plástico, debidamente desinfectadas con alcohol al 95% y cerradas herméticamente. Los frutos se colocaron sobre papel periódico humedecido y se dejaron por un lapso de 3 semanas. Durante ese tiempo, cada dos días se les humedeció y cada ocho días se realizaron las lecturas correspondientes. Se hicieron tres evaluaciones por hospedero.

A los frutos que presentaron síntomas de la enfermedad, se les aisló el hongo siguiendo los postulados de Koch. El hongo fue trasladado a cajas Petri nuevas con PDA para su desarrollo y posterior caracterización.

Se evaluó la coloración de la colonia en dos lugares, arriba y debajo de la caja Petri. Se midió el largo del micelio y el diámetro de la colonia (largo y ancho). Se describió la forma de la espora o conidio y la presencia de estructuras del hongo (acérvulos, conidios, micelios). Se midió el largo y ancho del conidio en 30 conidios por aislamiento u hospedero, para esta última variable, se siguió la metodología propuesta por Bernstein *et al.*, (1995). Se utilizó un microscopio tipo Olympus CH-2 con lente CWK de 20/18L; se usó además un micrómetro de escala 0-100 graduado en micras y una regla graduada en centímetros.

La caracterización se realizó cada ocho días, en frutos inicialmente inoculados y en los reinoculados. Se evaluó en los frutos de mango, el porcentaje de daño provocado por el *Colletotrichum*. Se realizaron tres lecturas en forma visual por síntomas, para cada uno de los aislamientos. Se tomaron los promedios de cada lectura.

Caracterización electroforética (isoenzimática)

Se tomaron extractos monospóricos de aislamientos (inoculados y re inoculados) de los nueve hospederos. Se colocaron doce discos de 0.8mm de diámetro en un erlenmeyer de 250 ml con 125 ml de PD (Papa-dextrosa). Los frascos se incubaron durante ocho días en un agitador orbital a 140 rpm a temperatura ambiente (24°C). El micelio se recogió en papel filtro Whatman N°12 y se filtró al vacío.

Se pesó una muestra de 2g por aislamiento, la cual se maceró en un mortero con arena de cuarzo y solución extractora (0,1M Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄+ 0,5M de Sacarosa + 0,001M Dithiotreitol (DTT), en 100 ml de solución bufer con pH 7,4 en proporción 1:2 p/v hongo y solución extractora.

Todo el proceso de macerado se realizó en hielo. Se recogió el producto del macerado en tubos cónicos. Estos se centrifugaron dos veces: la primera a 15.000rpm durante 15 minutos y la segunda a 17.000rpm en 30 minutos.

Se utilizó una centrífuga refrigerada (4°C) Hitachi, modelo Himac SCR 18B.

El supernadante se recogió en viales plásticos de 1,5ml de capacidad y se almacenaron a -70°C.

Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida en gradiente 3-25%.

La solución monomérica, se polimerizó con Temed y persulfato de amonio, y se vació en una placa formada por dos vidrios de espejo para electroforesis vertical.

La solución amortiguadora en el gel de separación fue 0,25M Tris-HCl, pH 8,9. La dosis de la muestra aplicada a cada ranura de la placa fue de 50µl más 5µl de azul de bromotimol, como tinción marcadora.

Se usó un gel de 4% de acrilamida para la concentración de las muestras (Stacking gel), preparado con Tris-HCl a pH 6,9.

Se utilizó un bufer de Tris-glicina a pH 8,4-8,6 como solución conductora de la tensión (búfer de electrodo).

La electroforesis se realizó con un aparato Pooma-Phor, (K. H. Muller, Hann. Mueden, Alemania). Se aplicaron 100 voltios durante dos horas, luego se aumentó a 200 voltios que se mantuvo hasta el final del proceso, el cual duró 23 horas. La temperatura durante todo el proceso fue de 7°C.

Concluido el proceso, se extrajeron los geles de las placas de vidrio y se colocaron en una bandeja plástica con agua destilada durante 20 minutos, al final de los cuales el agua se sustituyó

por la solución para revelado de las esterasas.

La solución consistió en 20 mg alfa-naftil acetato en 1ml de acetona al 50%; 20 mg beta-naftil acetato en 1ml de etanol al 95%, 40mg fast blue RR y 100ml 0,1M de Tris-HCl, pH 7,0. Los geles se sumergieron en esta solución 15-30 minutos en la oscuridad y en agitación constante hasta la aparición de los zimogramas. La reacción de tinción se detuvo sustituyéndola por ácido acético al 5%.

Los geles se colocaron sobre una mesa construida para observar diapositivas, se fotografiaron y se contó, en cada uno de los aislamientos evaluados, el número de bandas presentes.

Se hicieron zimogramas para el hongo (monospórico y para el no monospórico), después de ser inoculado en el fruto de mango.

Resultados

Características morfológicas

El color de la colonia y del micelio se presentó como una característica muy uniforme en todos los casos; predominó el color blanco y el negro en los nueve aislamientos del *Colletotrichum* (Cuadro 1).

El diámetro de la colonia varió entre 4,80 cm y 7,32 cm, estos resultados son muy similares entre los diferentes aislamientos, donde el menor resultado lo presentó el banano (dedo) con 4,80 cm y el mayor fue para los café con 7,32 cm (Cuadro 1).

La forma de la espora o conidio evidenció que hay predominio de la forma cilíndrica y fusiforme (en forma de cuña).

El largo del conidio varió entre 18,40 µm en el culantro a 25,25 µm en el mango. El ancho también fue variable entre 9,80 µm

Cuadro 1
Descripción morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. provenientes de diferentes hospederos en medio de cultivo PDA, luego de dos semanas de cultivo

Aislamiento	Colonia			Prom. del diámetro (cm)	Promedios en μm y Desv. Estándar del Conidio / espora			Altura del Micelio (cm)
	Color				Forma	Largo	Ancho	
	Centro	Borde	Inferior					
Culantro	Blanco	Blanco	Verde Negruzco	$7,27 \pm 1,37$	Cilíndrico	$18,40 \pm 0,37$	$9,95 \pm 0,18$	0,20
Gerbera	Blanco verdoso	Blanco	Verde Negruzco	$6,44 \pm 1,67$	Fusiformes cuneiforme	$16,80 \pm 0,50$	$14,7 \pm 0,00$	0,20
Banano corona	Violeta	Blanco Violeta	Blanco Amarillo	$6,72 \pm 0,62$	Cilíndrico	$18,62 \pm 0,61$	$10,0 \pm 0,30$	0,20
Café	Verde Negro	Blanco	Verde Negro	$7,32 \pm 1,44$	Fusiforme	$21,46 \pm 0,62$	$13,23 \pm 0,4$	0,10
Papaya	Verde blanco	Blanco	Blanco Verde	$5,92 \pm 1,90$	Semi cilíndrico	$17,02 \pm 0,56$	$14,5 \pm 0,18$	0,20
Banano dedo	Blanco	Blanco	Blanco Naranja	$4,80 \pm 1,73$	Fusiforme	$21,65 \pm 0,82$	$14,7 \pm 0,00$	0,40
Mango	Verde grisáceo	Blanco	Blanco Amarillo	$6,98 \pm 1,30$	Fusiforme	$25,25 \pm 0,71$	$14,7 \pm 0,00$	0,35
Aguacate	Blanco Verde	Blanco Verde	Blanco Amarillo	$6,47 \pm 2,08$	Fusiforme	$19,92 \pm 0,67$	$9,8 \pm 0,00$	0,30
Cítricos	Verde Negro	Verde Grisáceo	Blanco Negro	$7,12 \pm 0,71$	Cilíndrico	$20,00 \pm 0,57$	$20,0 \pm 0,00$	0,15

del aguacate a $20.0 \mu\text{m}$ de los cítricos, este parámetro es diferente entre aislamientos y hospederos (Cuadro 1).

La altura del micelio no presentó variación; hubo predominio de 0,20 cm como promedio, en la mayoría de los casos evaluados.

Los aislamientos que presentaron diferencias fueron el del café con 0,10 cm, el de los cítricos con 0,15 cm, el del aguacate con 0,30 cm, el de mango con 0,35 cm y el de banano dedo con 0,40 cm de alto (Cuadro 1).

Durante el periodo de evaluación se verificó en cada aislamiento la presencia o ausencia de estructuras del hongo y se encontró que todas las

muestras presentaron micelios y conidios.

La mayoría de ellos mostraron acérvulos, con excepción del aislamiento procedente del banano corona.

El color predominante del acérvulo en los diferentes hospederos fue el amarillo-naranja, excepto por el aislamiento de cítricos, que presentó acérvulos de color café-negruzcos.

Evaluación de la patogenicidad

Los aislamientos provenientes del aguacate, gerbera, café, papaya y mango, indujeron síntomas de la enfermedad sobre los frutos de mango inoculados, mientras que los

aislamientos de culantro, banano (dedo y corona) y cítricos no presentaron sintomatología de la enfermedad.

El aislamiento de aguacate fue el más patogénico de todos con un 100%, luego el de mango con 78% (Cuadro 2).

Estos valores cambiaron, cuando se re-aislaron y se inocularon por segunda vez en los frutos de mango.

El aislamiento proveniente del mango fue, esta vez, el más patogénico con un 100%, luego el de gerbera con un 90% y el de aguacate descendió bruscamente a 33%. En los dos casos, se mantuvo el aislamiento de culantro, como no patogénico al mango con 0%. Los otros aislamientos conservaron un valor intermedio (Cuadro 3).

Características bioquímicas

Los cultivos monospóricos se caracterizaron basados en la velocidad de migración de sus diferentes bandas, indicando en el zimograma su identificación entre cada uno de los diferentes hospederos.

El estudio isoenzimático de los nueve hospederos de *C. gloeosporioides*,

mostró un patrón similar entre sí, cuando se relacionan diferentes extractos del mismo hospedero (Figura 1).

De acuerdo con la figura 1, hay similitud entre los tratamientos de cítricos (C₁ y C₃), culantro (Cu₁ y Cu₃), gerbera (Ge₂ y Ge₃), café (Ca₁ y Ca₃), etc.

El patrón es diferente cuando el análisis se da entre diferentes hospederos, cada uno mantiene su identidad y es marcado por el número de bandas y su posición en el gel.

Se detectan diferencias entre banano dedo y cítricos, mango y gerbera, café y culantro, etc.

Por este método se logró también separar entre el banano dedo (Bd) y banano corona (Bc), indicando que existe especificidad del hongo por el tejido o sustrato.

Cuando se realizó la electroforesis, a los extractos procedentes de los hospederos inoculados, y se compararon éstos, con los aislamientos monospóricos (Figura 2), la relación en la identificación fue diferente para algunos de los aislamientos que fueron patogénicos al mango; por ejemplo, el aislamiento

Cuadro 2
Patogenicidad en mango de diferentes aislamientos de *Colletotrichum* provenientes de nueve hospederos inoculados en mango

Aislamiento	Repeticiones												Patogenicidad %
	1		2		3		4		5		6		
	CH	SH	CH	SH	CH	SH	CH	SH	CH	SH	CH	SH	
Gerbera	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	56
Banano corona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Aguacate	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	100
Cítricos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Banano dedo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Mango	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	78
Café	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	45
Papaya	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	56
Culantro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Cuadro 3
Patogenicidad de los diferentes reaislamientos de los hospederos inoculados en el mango

Aislamiento	REPETICIONES																Patogenicidad %
	1		2		3		4										
	Trat.	Test.	Trat.	Test.	Trat.	Test.	Trat.	Test.	Trat.	Test.	Trat.	Test.	Trat.	Test.			
	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	
Culantro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Mango	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-					100
Banano corona	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	50
Aguacate	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-					33
Gerbera	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	90
Café	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	50
Papaya	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-					50
Banano dedo	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	50
Cítricos					+	-	-	-	+	-	-	-					33

banano corona (Bc₃, monospórico), difiere de si mismo (Bc, inoculado) en el apareamiento en éste último, de nuevas bandas, las número 8, 15 y 16, que no están en el monospórico.

Igual sucede con el banano dedo (Bd1, monospórico) y banano dedo (Bd, inoculado), en el primero, la banda 6 está ausente, mientras que en el segundo, la banda 9 no existe.

El mismo tipo de respuesta se obtuvo para el resto de los aislamientos evaluados.

Discusión

De los resultados observados en las variables morfológicas, especialmente el color de la colonia, tanto sobre la caja Petri como por debajo de la misma, se concluye que dicha variable, no es un buen criterio para separar especies de *Colletotrichum*, pues la mayoría presentaron colores, blanco y negro.

Lo mismo sucedió con el diámetro de la colonia, y la forma de la espora o conidio, que en este estudio fueron muy similares entre los diferentes aislamientos, lo que obliga a descartar

estos criterios como descriptores morfológicos de clasificación entre especies.

El tamaño del micelio, al igual que los anteriores parámetros, es muy uniforme y no sirve para separar especies del hongo.

Resultados parecidos fueron obtenidos por Bonde *et al.*, (1993), Smith y Black (1990), quienes compararon especies de *C. gloeosporioides* provenientes de la fresa.

En este estudio se consideró solo al tamaño del conidio o espora, como adecuado, para ser usado como descriptor morfológico, a pesar de lo difícil (por laborioso) y por basarse solamente en un solo criterio de clasificación (largo y ancho del conidio), para separar especies del hongo, por ejemplo, entre conidios del *C. gloeosporioides* proveniente del culantro (18,40 y 9,95 µm) y del banano corona (18,62 y 10,0 µm); como entre gerbera (16,80 y 14,70 µm) y papaya (17,02 y 14,50 µm); lo mismo sucede entre café, banano dedo y cítricos (Cuadro 1).

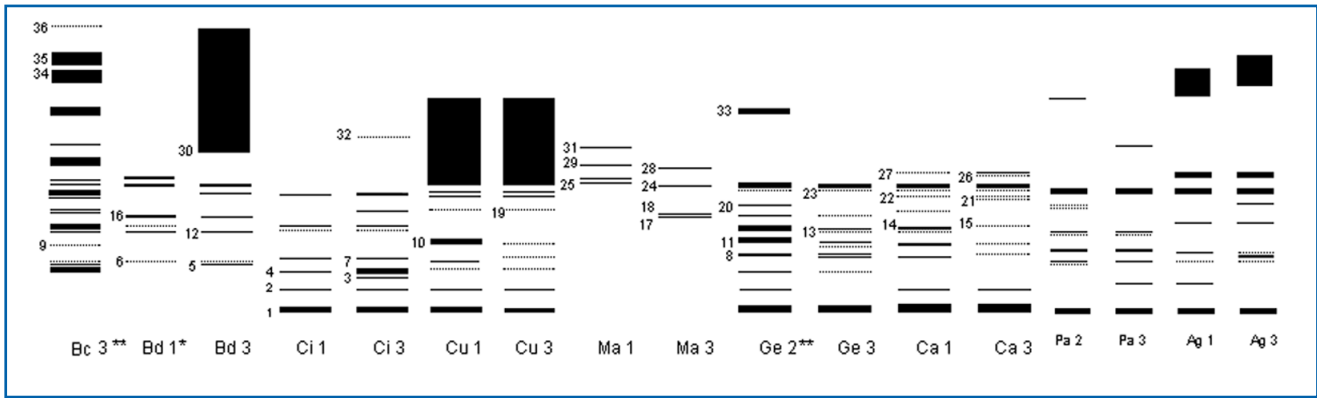


Fig.1
Fenotipos electroforéticos utilizando alfa y beta esterasa asignados a 9 aislamientos de *Colletotrichum* spp, provenientes de diferentes hospederos e inoculados en mango

* Cultivo monospórico

**Cultivo de sección de micelio de "cultivo monospórico"

Bc: Banano corona

Bd: Banano dedo

Ci: Cítricos

Cu: Culantro

Pa: Papaya

Ma: Mango

Ge: Gerbera

Ca: Café

Ag: Aguacate

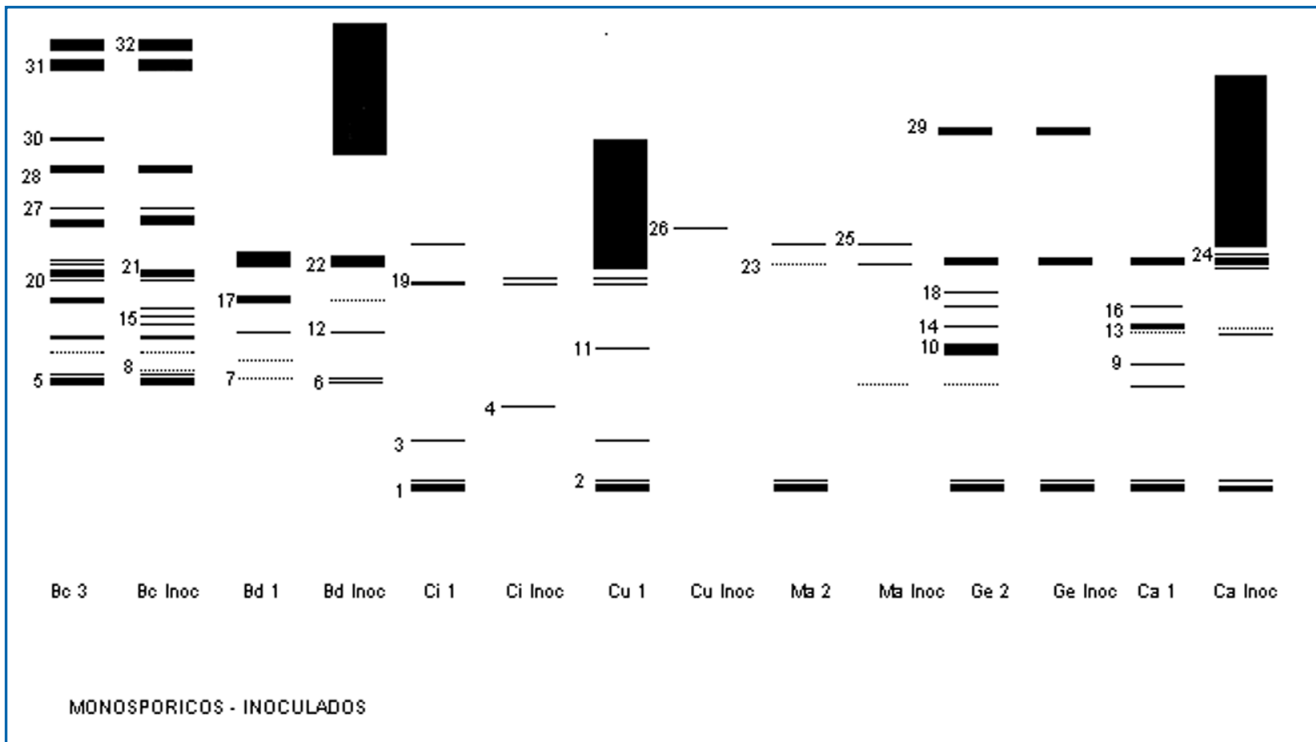


Fig. 2
Fenotipos electroforéticos asignados a 7 aislamientos monoespóricos de *Colletotrichum gloeosporioides*, inoculados al mango utilizando alfa y beta esterasa

Bc: Banano corona

Ci: Cítricos

Ma: Mango

Ca: Café

Bd: Banano dedo

Cu: Culantro

Ge: Gerbera

Estos resultados coinciden con Denoyes y Baudry (1995), que sugieren que de todos los parámetros morfológicos analizados, solo el tamaño del conidio se considera útil para poder separar especies del patógeno.

Muchos de los parámetros morfológicos de clasificación taxonómica, son inseguros, pues se ven influenciados por varios factores externos, como son: la temperatura, el pH, la edad del medio de cultivo y del hongo y, sobre todo, la existencia de otros tipos intermedios de tamaño de colonia.

La variación en el porcentaje de patogenicidad en este estudio se debió a diferentes causas; entre ellas se citan el manejo del inóculo durante las inoculaciones y la edad del medio de cultivo, en donde se desarrolló el hongo, además de las condiciones de almacenamiento del hongo en el laboratorio.

El almacenamiento prolongado también atenúa la eficacia patogénica del mismo (Nicholson *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1986).

Después de la inoculación en el hospedero, el hongo reasume su patogenicidad, la práctica misma de la re inoculación, para restaurar la patogenicidad del hongo, lo cual implica variación en su fisiología. Esta sería una de las explicaciones del aumento en el porcentaje de daño en la mayoría de los reaislamientos, especialmente en el mango, y el descenso en otros.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Quimio y Quimio (1975), quienes encontraron diferencias en once aislamientos de *C. gloeosporioides*, en mango "Carabao".

La comparación de los perfiles de proteínas de los diferentes aislamientos de *C. gloeosporioides*, mostraron una similitud marcada. Igual sucedió con

los perfiles de proteínas procedentes del mismo hospedero y de diferentes puntos geográficos, los cuales fueron bastante uniformes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kaufmann y Weidemann (1996).

Sin embargo, Cisar *et al.*, (1994), considera que recientemente se ha observado que algunos aislamientos de *C. gloeosporioides* presentan patogenicidad diferenciada con respecto al hospedero con el cual puede ser sexualmente compatible.

La mayoría de los aislamientos presentaron un patrón electroforético de bandas múltiples, a pesar de provenir de cultivos monospóricos, los cuales son haploides.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kaufmann y Weidemann (1996), quienes encontraron que *C. gloeosporioides* produce conidios uninucleados o haploides y que todos los cultivos o aislamientos proceden de esporas individuales o monosporas.

El apareamiento de bandas múltiples, puede ser atribuido a la heterocariosis. Laroche *et al.*, citado por Kaufmann y Weidemann (1996), dicen que la multiplicidad de bandas es atribuible a la producción de isoenzimas secundarias por el proceso de postraslación.

En este estudio, el número de bandas y su tamaño fueron consistentes para cada hospedero, ya fueran éstos, monospóricos o reinoculados.

Resultados similares han sido descritos para *Colletotrichum gloeosporioides* en mango con pectinasas por Gantotti y Davis (1993); estos autores compararon 10 grupos distintos de aislamientos de *C. gloeosporioides* de mango provenientes de diferentes partes del árbol, donde 3 provenían de las hojas, 1 de la panícula, 2 de frutos inmaduros y 4 de frutos maduros cosechados; se logró

separar los diferentes grupos por el patrón de bandas.

Según estos resultados, los análisis con pectinasas no solo demostraron la diversidad genética entre la población del patógeno de la antracnosis del mango, sino que indicó que varios aislamientos se distribuyen preferencialmente en diferentes tejidos del árbol de mango. Los zimogramas demostraron también que los miembros de cada patrón tienen gran potencial a colonizar y causar síntomas de la enfermedad en unos tejidos más que en otros.

Agradecimiento

El autor agradece sinceramente a la Universidad de Costa Rica (UCR), en especial a la Escuela de Fitopatología y al laboratorio de Postcosecha, sitio donde se llevó a cabo toda la parte de patología y manejo del fruto.

Agradezco particularmente al doctor Felipe Araúz y a la Master Gerardina Umaña, por la asesoría, guía y correcciones a este documento, así como al Master Jorge Herrera del laboratorio de granos y semillas (CIGRAS), por los consejos y aportes al trabajo de investigación.

Un agradecimiento muy especial al Master Luis Gómez, por la excelente ayuda, apoyo moral y entrega en la culminación de este trabajo, y sobre todo por su amistad, orientación y asistencia en el laboratorio del Centro de Investigación Agrícola de la Universidad de Costa Rica (CIA), donde se realizó la parte de electroforesis de isoenzimas.

Al Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), y en especial a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE), por darme la oportunidad de obtener mi grado de maestría en Protección de Cultivos, otorgado por la UCR, y de

aportar los recursos económicos para lograrlo, y por confiar en mí.

Literatura consultada

- Agrios, G. N. 1988. Fitopatología. Limusa, México 2da. ed. 756 p.
- Araúz, L. F. 1995. Combate de Antracnosis en mango. Memoria 2do. Seminario Internacional del cultivo de mango. Puntarenas, Costa Rica. pp 56-70.
- Benavides, L. C. 1995. El mango en el mercado internacional. Memoria 2do, Seminario internacional del cultivo de mango. Puntarenas, Costa Rica. pp 189- 198.
- Bernstein, B.; Zehr, E. I.; Dean, R. A. 1995. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan and others hosts. Plant Disease. 79 (5): 478-482.
- Bonde, R. M.; Micales, J. A.; Peterson, G. L. 1993. The use of isozyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. Plant Disease 10: 961-967.
- Bonde, R. M.; Peterson, G. L.; Maas, J. L. 1991. Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Phytopathology 81(12): 1523-1528.
- Brooker, N. L.; Leslie, J. F.; Dickman, M. B. 1991. Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of Vegetative Compatibility and genetic relatedness. Phytopathology 81(6): 672-677.
- Cisar, C.; Spiegel, F.; Tebeest, D.; Trout, C. 1994. Evidence for mating between isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* with different host specificities. Currently Genetic. 25: 330-335.
- Denoyes, B.; Baudry, A. 1995. Species identification and pathogenicity study of french *Colletotrichum* strains isolated from strawberry morphological and cultural characteristics. Phytopathology 85 (1): 53-57.
- Gantotti, B. V.; Davies, M. J. 1993. Pectic zymogram analysis for characterizing genetics diversity of the mango anthracnose pathogen. Acta Horticulturae 341, Mango IV. Florida, pp 353-359.
- González, L. C. 1979. Introducción a la Fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. IICA, CR. 148 p.

- Kaufmann, P. J.; Weidemann, G. J. 1996. Isozyme analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* from five host genera. Plant Disease 80: 1289-1293.
- Kim, W. G.; Cho, E. K.; Lee, E. J. 1986. Two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose on pepper fruits. Korean Journal of Plant Pathology 2: 107-113.
- Nicholson, R. L.; Butler, L. G.; Asquith, T. N. 1988. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that Bind phenols: Implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. Phytopathology 76 (12): 1315-1318.
- Quimio, T. H.; Quimio, A. J. 1975. Notes of Philippine grape and guava anthracnose. Plant Disease Reporter 59: 221- 224.
- Smith, B. J.; Black, L. L. 1990. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Disease 74 (1): 69-76.