

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL
CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA**

**Área de Diagnóstico Fitosanitario
Laboratorio de Micología**

Protocolo de Diagnóstico:
Colletotrichum coccodes
(Antracnosis del tomate y chile)

Tecámac, Estado de México, julio 2019



**GOBIERNO DE
MÉXICO**

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

Senasica, agricultura sana para el bienestar



Aviso

El presente protocolo de diagnóstico fitosanitario fue desarrollado en las instalaciones de la Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), con el objetivo de diagnosticar específicamente la presencia o ausencia de *Colletotrichum coccodes*. La metodología descrita, tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el protocolo de forma correcta.

La presente versión podrá ser mejorada y/o actualizada quedando el registro en el historial de cambios.



I. ÍNDICE

1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1 Información sobre la plaga	1
2.2 Información taxonómica.....	2
2.3 Flujo de trabajo.....	4
3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	5
3.1 Identificación morfométrica	5
3.1.1 Observación directa y cortes histológicos.....	5
3.1.2 Incubación en papel secante.....	6
3.1.3 Aislamiento en medios de cultivo	7
3.2 Descripción morfométrica	8
3.2.1 Descripción colonial	8
3.2.2 Descripción morfométrica	10
3.3 Identificación del patógeno	11
4. REGISTROS.....	12
5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL	12
6. RECONOCIMIENTO.....	12
7. REFERENCIAS	13
8. ANEXOS	16
8.1 Signos y síntomas	16
8.2 Ciclo de la enfermedad.....	17
8.3 Elaboración de montajes.....	18
8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos.....	18
8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva	18
8.3.3 Preparaciones permanentes	18
8.4 Medios de montaje	19
8.5 Medios de cultivo	19
8.6 Corroboración molecular.....	20
8.6.1 Extracción de DNA.....	20
8.6.2 Verificación de la calidad del DNA.....	21
8.6.3 PCR punto final	21
8.6.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final.....	23
8.6.5 Corroboración mediante Filogenia Molecular	23

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento colonial de <i>Colletotrichum coccodes</i> en medio de cultivo EMA, con concentración de microesclerocios al centro de la colonia y arreglo radial de microesclerocios hacia la periferia.	8
Figura 2. Diferenciación colonial de especies de <i>Colletotricum</i> , incubación a 25 °C durante 8 días.	9
Figura 3. Apariencia colonial de especies de <i>Colletotrichum</i> sobre PDA.....	9
Figura 4. Estructuras de reproducción de <i>Colletotrichum coccodes</i>	10
Figura 5. Estructuras de <i>Colletotrichum coccodes</i>	11
Figura 6. Síntomas causados por <i>Colletotrichum coccodes</i> en tomate y chile.	16



Figura 7. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum coccodes</i> en tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).	17
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Colletotrichum coccodes</i> en chile (<i>Capsicum annum L.</i>).	17
Figura 9. Ensayo de control endógeno con el par de primers ITS-1 e ITS-4	23
Figura 10. Alineamiento de secuencias utilizando Nucleotide BLAST.	24
Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias.	26
Figura 12. Filogenia molecular.	26

III. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medios de montaje recomendados	19
Cuadro 2. Medios de cultivo recomendados	19
Cuadro 3. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno ribosomal	21
Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno	22
Cuadro 5. Programa de termociclaje para la detección del control endógeno	22



1. OBJETIVO Y ALCANCE DEL PROTOCOLO

Describir la metodología aplicada en el Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la detección e identificación de *Colletotrichum coccodes* mediante caracterización morfológica y técnicas moleculares a partir de semillas y material vegetal de tomate y chile, bajo las condiciones de uso de reactivos que aquí se detallan.

Este método es apropiado para tejido vegetal de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de chile (*Capsicum* sp.) que presente signos y síntomas característicos, como tallos o frutos, así como a partir de semilla de ambos cultivos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Información sobre la plaga

C. coccodes es el agente etiológico de la enfermedad conocida como antracnosis o pudrición negra en solanáceas. Afecta principalmente cultivos de papa, tomate y chile (Costa, Pfenning y Pozza, 2006; Jamiotkowska Skwaryto y Patkowska, 2018); sin embargo, también se ha reportado su aislamiento a partir calabacín, crisantemo, berro, col, lechuga y distintas malezas (Dillard y Cobb, 1998; Raid y Pennypacker, 1987; Gilardi *et al.*, 2013).

Los daños ocasionados por el patógeno consisten en la reducción de la calidad y cantidad del fruto, así como en el aumento de los costos de producción y manejo post cosecha. En tomate y chile pimienta afecta tallos, raíces y frutos, formando una lesión circular, hundida, con oscurecimiento en la parte central y abundante producción de acérvulos, setas y microesclerocios (Costa *et al.*, 2006).

Dillar (1992) indica que en plantas infectadas de tomate se presentan tres tipos de pudriciones: pudrición de la corteza de las raíces laterales, pudrición del corcho y pudrición de la base del tallo. En estudios posteriores, Ben *et al.*, (2009) encontraron que en frutos de tomate enfermos el patógeno infecta del 20 al 63 % de las semillas; mientras que en la variedad US-39 transformada genéticamente, *C. coccodes* infectó el 40 % de la testa (pubescencia y superficie) y el 1 % del embrión.

En Chile la infección se presenta durante las primeras etapas de desarrollo manifestando la sintomatología típica de la enfermedad, no obstante, cuando la infección se presenta en etapas avanzadas de crecimiento de la planta, éstas son asintomáticas. En Asia, China, Corea, India y Tailandia, el cultivo del chile también es afectado por otras especies del género *Colletotrichum*, como *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *C. dematium*, *C. acutatum* y *C. boniense* (Jamiotkowska *et al.*, 2018).

Jamiotkowska *et al.*, (2018) mencionan que las principales fuentes de inóculo son el suelo y los residuos de cosecha por lo que la infección puede iniciar al momento de la germinación de la



semilla, causando la muerte de las plántulas; sin embargo, también puede infectar a raíces jóvenes y viejas, donde se caracteriza por formar grandes masas de microesclerocios. Dillard y Cobb (1998) reportaron que el 90 % de los esclerocios del patógeno permanecen viables durante 8 años enterrados a 10 cm.

El patógeno se dispersa por medio del viento y salpique de agua de lluvia (conidios), semilla infectada (ya sea contaminada externamente o con el embrión infectado), plántulas infectadas que fueron germinadas en sustratos o suelo contaminado, frutos enfermos, frutos con infecciones latentes (verdes o inmaduros) y tubérculos infectados (Andrivon, Lucas, Guérin y Jouan, 1998; Byrne, Hausbeck, Meloche y Jarosz, 1998; Dillard y Cobb, 1998; Lees y Hilton 2003; Ben y Tsrer 2019; Pasche, Taylor y Gudmestad, 2010).

No existen reportes de la presencia de *C. coccodes* en México, tampoco aparece en la lista de plagas cuarentenadas del país. Sin embargo, se encuentra regulado en el Módulo de Requisitos Fitosanitarios de SENASICA para la importación de semillas de chile (*C. annum*) con origen y procedencia Alemania, origen Alemania y procedencia Francia, además con origen Alemania y procedencia Estados Unidos (SENASICA, 2019).

2.2 Información taxonómica

Nombre Anamorfo: *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) 1958

Sinónimos: *Acrothecium solani* Sacc. (1833)

Vermicularia varians Ducomet (1908)

Colletotrichum colanicola O’Gara (1915)

Colletotrichum atromentarium Berk. & Broome (1916)

Colletotrichum biologicum Chaudhuri (1924)

(Hughes, 1958)

Nombres comunes: Antracnosis del tomate (español)

Antracnosis de la patata (español)

Anthrachnose of potato (inglés)

Anthrachnose of tomato (inglés)

Black dot disease of potato (inglés)

Foot rot of tomato (inglés)

Ripe rot of tomato (inglés)

Anthrachnose de la tomate (francés)

Dartrose de la tomate (francés)

Dartrose de la pomme de terre (francés)

Anthrachnose tomate (alemán)

(CABI/EPPO, 2011)



Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

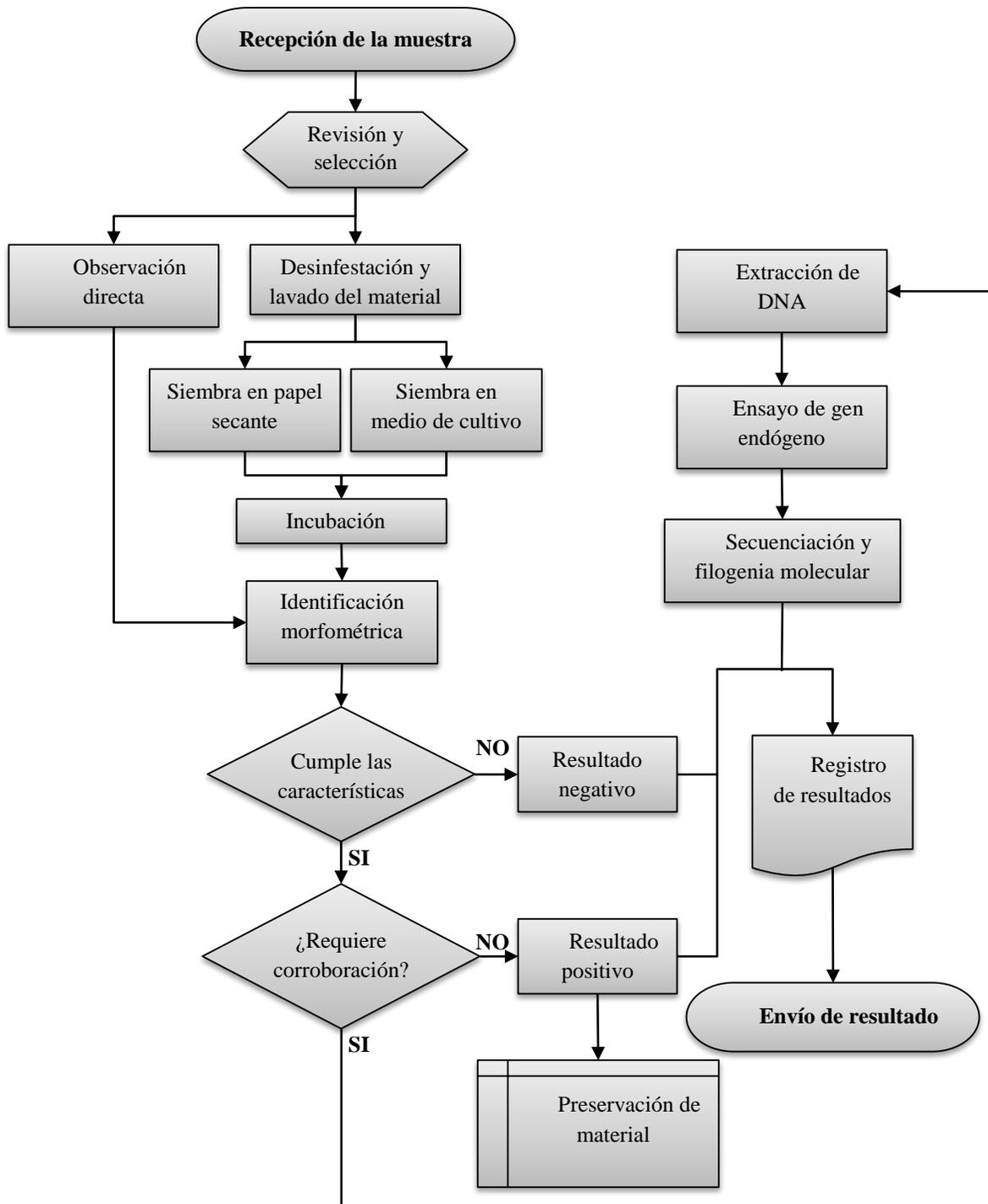
Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum*

Especie: *Colletotrichum coccodes*.

(Hughes, 1958)

2.3 Flujo de trabajo





3. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Para determinar la presencia de *C. coccodes*, es necesario contar con material vegetal que presente signos y síntomas característicos.

La detección de *C. coccodes* a partir de semilla de chile y tomate es rápida y precisa, utilizando la técnica de incubación en medio de cultivo (Young et al, 2018).

Si la muestra no cumple con las características requeridas o se encuentra en mal estado, se registra el motivo del rechazo: “Material en mal estado” o “No se procesó” y se especifican los motivos del rechazo.

3.1 Identificación morfométrica

La identificación morfométrica se puede realizar por observación directa de cortes histológicos, a partir de signos en el tejido vegetal (tallos, raíces y frutos) o del crecimiento de las estructuras en papel secante y medio de cultivo a partir de tejido vegetal o semilla.

3.1.1 Observación directa y cortes histológicos

- 1) Partir de tallos, raíces o frutos con presencia de síntomas y observar con un microscopio estereoscópico signos del hongo (acérvulos o microesclerocios).
- 2) Obtener fragmentos de aproximadamente 0.2 mm de grosor, utilizando navaja de bisturí o navaja de afeitar.
- 3) Elaborar montajes temporales o permanentes (Anexo 8.3) para su observación con un microscopio compuesto. Marcar las preparaciones con el número de identificación y los datos de la muestra.
- 4) Medir las estructuras del hongo, obtener el ancho y largo de éstos, y comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia, con el fin de definir el género y especie de acuerdo a la descripción morfométrica (Sección 3.2).

3.1.1.1 Interpretación de resultados

En caso de que los signos observados en el tejido vegetal correspondan a microesclerocios, acérvulos y conidios y coincidan con la descripción de *C. coccodes*, la técnica se reporta como positiva. Si no se detecta presencia de estructuras características de *C. coccodes*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo.

En ambos casos, el resultado debe corroborarse con otras técnicas de diagnóstico como aislamiento e incubación en medio de cultivo y papel secante (secciones 3.1.2 y 3.1.3).



3.1.2 Incubación en papel secante

- 1) A partir de tejido vegetal con o sin síntomas y signos del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm², en condiciones asépticas desinfectarlos con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto y enjuagar en 3 ocasiones con agua destilada estéril. Permitir el secado del material vegetal, para ello, colocar los fragmentos sobre papel absorbente estéril durante un periodo aproximado de 2 a 3 horas.

En el caso de semillas, si el tamaño de la muestra lo permite, utilizar 200 semillas o 40% de la muestra para su incubación en papel secante; desinfectarlas con hipoclorito de sodio al 0.5%, durante 2 min, enjuagar con agua destilada estéril y secar durante los tiempos señalados para el tejido vegetal.

- 2) Preparar cámaras húmedas, para ello colocar en cajas Petri de cristal un círculo de papel filtro Whatman® del número 4 (puede utilizarse otro tipo de papel filtro o papel absorbente) y esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 °C y 15 psi (libras por pulgada cuadrada, por sus siglas en inglés) o durante 2 horas a 160 °C con calor seco. Una vez que las cajas están estériles y frías, humedecer el papel filtro con agua destilada estéril (evitar tener exceso de agua) y marcar con los datos de identificación de la muestra.
- 3) Colocar en la cámara húmeda de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco o 30 semillas por caja. Incubar durante 5 días a 25 °C y 80% de humedad.
- 4) Observar con un microscopio estereoscópico si hay estructuras del hongo, realizar el montaje para visualizar sus características (Anexo 8.3).
- 5) Obtener la germinación de conidios para observar la forma y tamaño de los apresorios. Colocar una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, con un alfiler entomológico o aguja de disección, tomar masas de conidios a partir del medio de cultivo o del tejido vegetal y depositarlas en la gota de agua. Colocar el portaobjetos con conidios dentro de una cámara húmeda e incubar a 25°C ± 3°C durante 4 a 8 horas.
- 6) A partir de las estructuras, obtener montajes temporales o permanentes para su observación con un microscopio compuesto. Medir las estructuras del hongo y obtener el intervalo de medidas del ancho y largo. Comparar las dimensiones con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo de acuerdo con las características morfométricas que presenten (Sección 3.2).

3.1.2.1 Interpretación de resultados

Si con la técnica de incubación en papel secante, se obtienen estructuras típicas del hongo sobre el tejido vegetal o semilla, que correspondan a *C. coccodes*, el resultado de la técnica se reporta como positivo. Si no se detecta presencia de estructuras características de *C. coccodes*, se debe reportar el diagnóstico para esta técnica como negativo.



En ambos casos se recomienda corroborar los resultados con los obtenidos en la técnica de incubación en medios de cultivo (3.1.3).

3.1.3 Aislamiento en medios de cultivo

- 1) A partir de tejido vegetal, con o sin presencia de síntomas y signos del hongo, obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm², desinfectarlos y secarlos.

En el caso de semillas, si el tamaño de la muestra lo permite, utilizar 200 semillas o 40% de la muestra para su incubación en papel secante, desinfectarlas con hipoclorito de sodio al 0.5%, durante 2 min, enjuagar con agua destilada estéril y secar durante los tiempos señalados para el tejido vegetal.

- 2) Sembrar de 5 a 6 fragmentos secos en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar, por sus siglas en inglés), EMA (Extracto de Malta Agar, por sus siglas en inglés) u OA (Avena Agar, por sus siglas en inglés) (para la preparación de medios de cultivo ver Anexo 8.5) o 30 semillas por caja, incubar a 25 °C ± 3 °C durante 5 días.
- 3) A partir de colonias típicas del hongo (Sección 3.2.3) realizar aislamientos para obtener cultivos puros en medio de cultivo PDA, EMA u OA (ver Sección 8.5).
- 4) Incubar los aislamientos puros durante 8 a 12 días con oscuridad a 25 °C, al término de este tiempo observar el tipo de crecimiento, coloración del micelio y del medio de cultivo, además de la formación de estructuras del hongo (acérvulos, conidios, microesclerocios) y obtener apresorios de acuerdo al apartado 3.1.2.
- 5) Obtener preparaciones temporales o permanentes (Anexo 8.3) de las estructuras y observar con un microscopio compuesto.
- 6) Medir las estructuras del hongo y obtener el intervalo y promedio del ancho y largo de éstos. Comparar las dimensiones obtenidas con la literatura de referencia para definir el género y especie del hongo (Sección 3.2).

3.1.3.1 Interpretación de resultados

Para determinar la presencia del patógeno se deben obtener colonias con micelio hialino, agregación de microesclerocios en la parte central (lo cual le confiere una coloración negra) y con arreglo radiado hacia la periferia, con desarrollo de acérvulos característicos de *C. coccodes*; así como observar las estructuras características del hongo descritas en la siguiente sección (Sección 3.2). Si se obtienen estructuras típicas, el resultado de la técnica se reporta como positivo.

Si fuera necesario corroborar estos resultados, se debe seguir el procedimiento descrito en el Anexo 8.6 para la extracción de DNA y análisis filogenético.

Si no se detecta presencia de estructuras características de *C. coccodes*, el diagnóstico se debe reportar negativo para esta técnica.

3.2 Descripción morfológica

3.2.1 Descripción colonial

Colonias en medio EMA, con crecimiento de 8.4 a 9.0 cm en 12 días, sin coloración del sustrato tanto por el anverso como por el reverso de la caja; conidios formando masas de color amarillo a rosado; esclerocios abundantes, de color negro, concentrados en la parte central de la colonia y escasos con arreglo radial hacia la periferia de la colonia (Costa, et al, 2006; Jamiotkowska et al., 2018) (Figura 1).

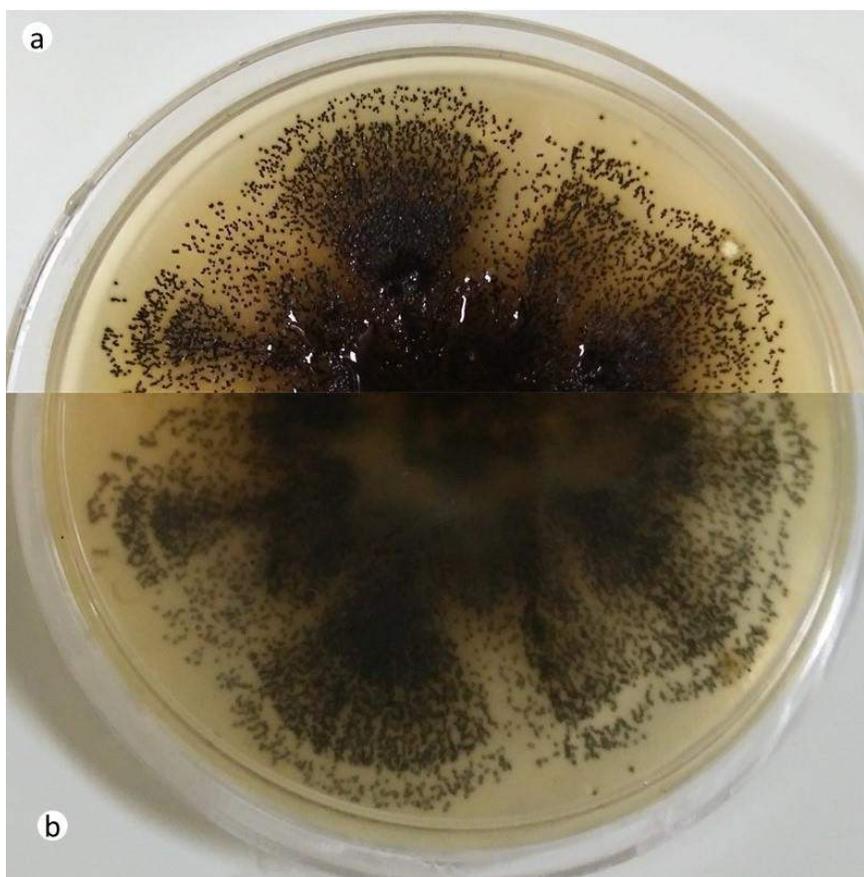


Figura 1. Crecimiento colonial de *Colletotrichum coccodes* en medio de cultivo EMA, con concentración de microesclerocios al centro de la colonia y arreglo radial de microesclerocios hacia la periferia. a) anverso de la caja; b) reverso de la caja.

La diferenciación de la especie en solanáceas se basa en la formación de microesclerocios, los cuales son abundantes tanto en tejido vegetal, como en medio de cultivo, mismos que no se presentan con *C. gloeosporioides*, *C. siamense* y *C. acutatum* (Costa et al., 2006) (Figuras 2 y 3).

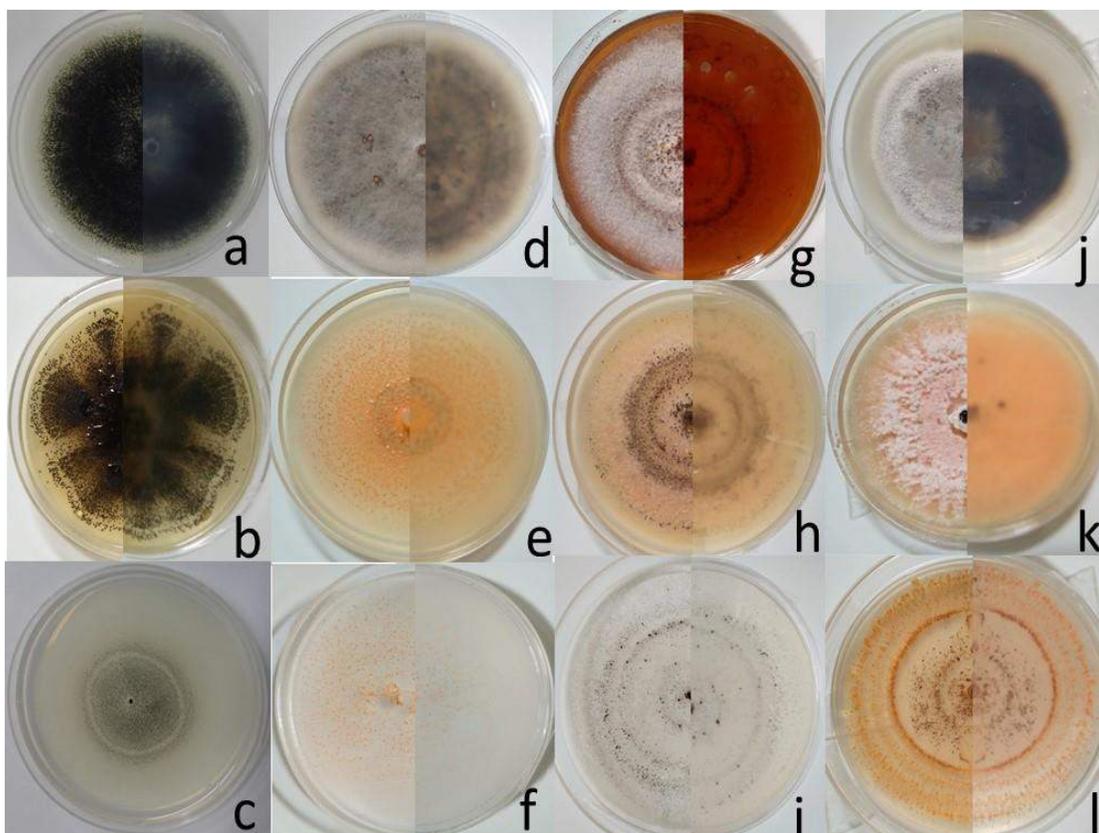


Figura 2. Diferenciación colonial de especies de *Colletotrichum*, incubación a 25 °C durante 8 días. A la derecha el anverso de la caja y a la izquierda el reverso; a,d,g,j) Papa Dextrosa Agar; b,e,h,k) Extracto de Malta Agar; c,f,i,l) Harina de Avena Agar; a-c) *C. coccodes*; d-f) *C. gloeosporioides*; g-i) *C. siamense*; j-l) *C. acutatum*.

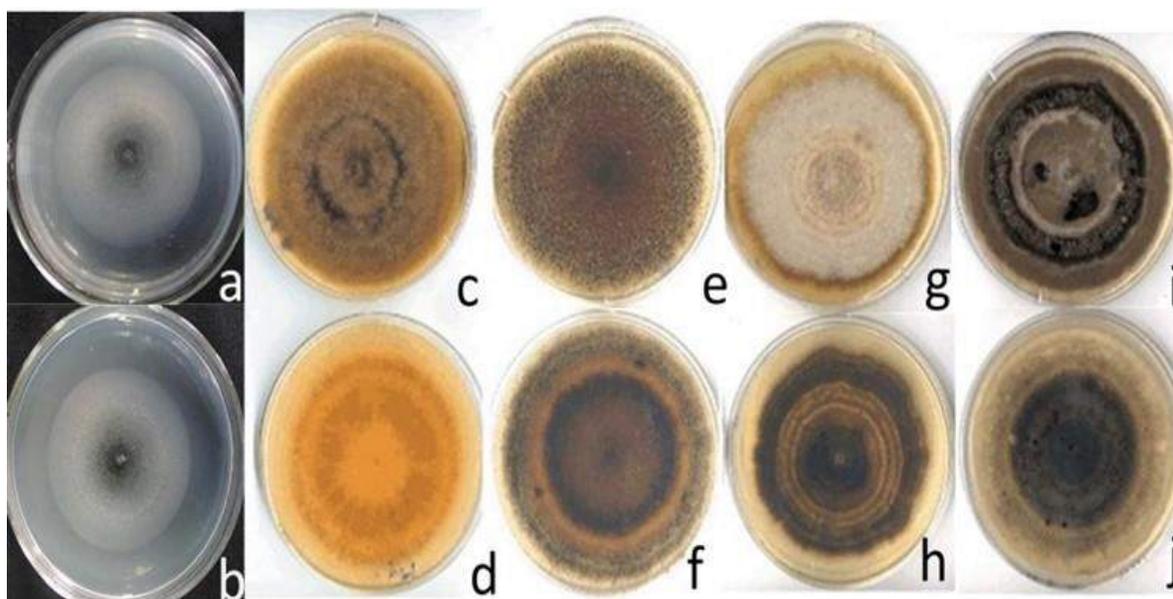


Figura 3. Apariencia colonial de especies de *Colletotrichum* sobre PDA. a-b) *C. coccodes*; c-f) *C. gloeosporioides*; g-h) *C. acutatum*; i-j) *C. capsici*. (a y b: Liu et al., 2011; c-j: Than et al., 2008).

3.2.2 Descripción morfométrica

Acérvulos de 250-315 x 3.2-63.2 μm con setas; conidios de 13.3-22.0 x 2.3-4.0 μm , fusiformes, con extremidades obtusas, hialinos, aseptados, formando masas de color amarillo a rosado; esclerocios de 100-500 μm de diámetro, abundantes, globosos, de color negro, concentrados en la parte central de la colonia y escasos con arreglo radial hacia la periferia de la colonia. (Costa et al., 2006; Jamiotkowska et al., 2018) (Figuras 4 y 5).

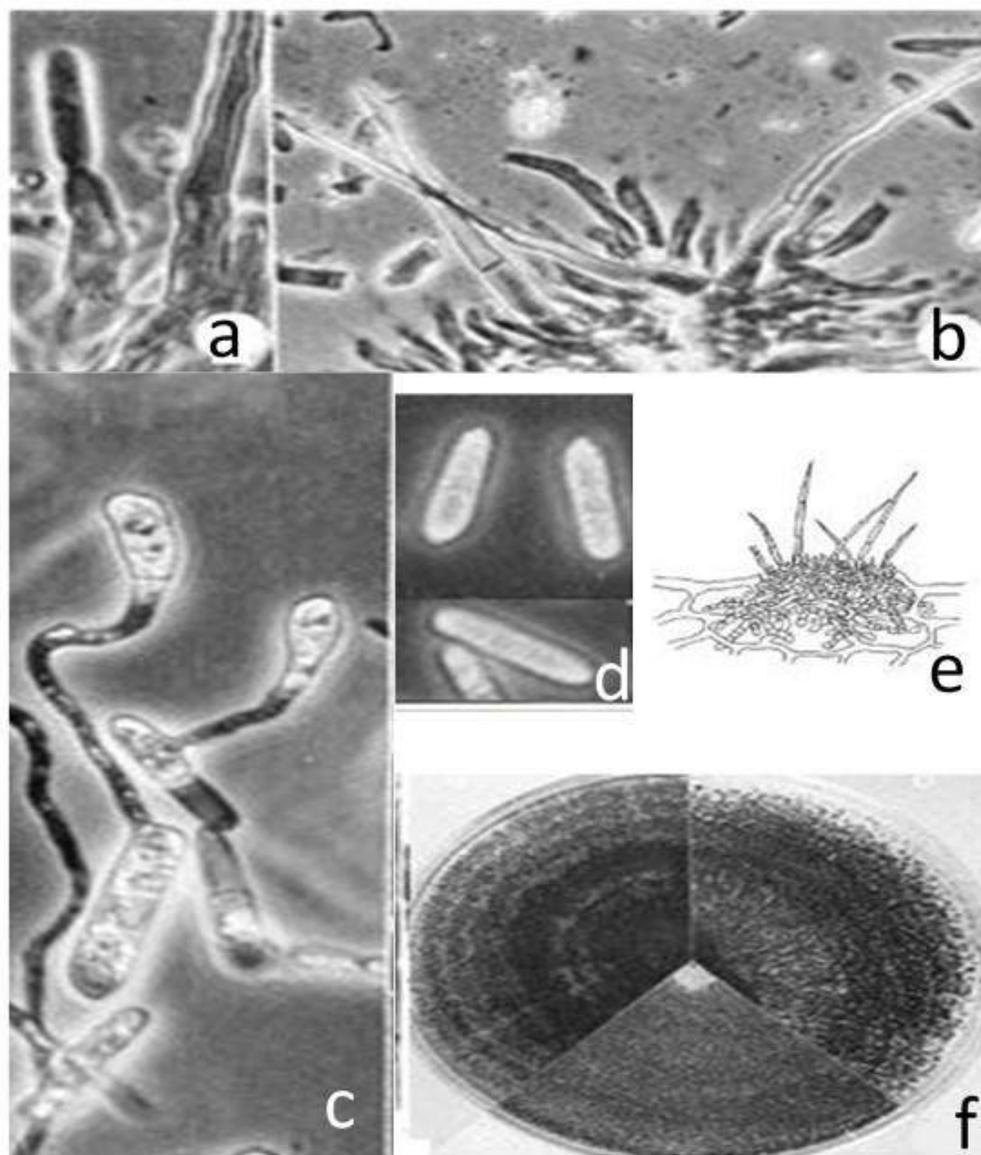


Figura 4. Estructuras de reproducción de *Colletotrichum coccodes*. a, b, e) acérvulo con setas; c) apesorios d) conidios f) Colonia con 20 días de incubación a temperatura ambiente en Extracto de Malta Agar a la izquierda, Papa Dextrosa Agar a la derecha y Avena Agar al 2% abajo (Kokko et al., 1974).

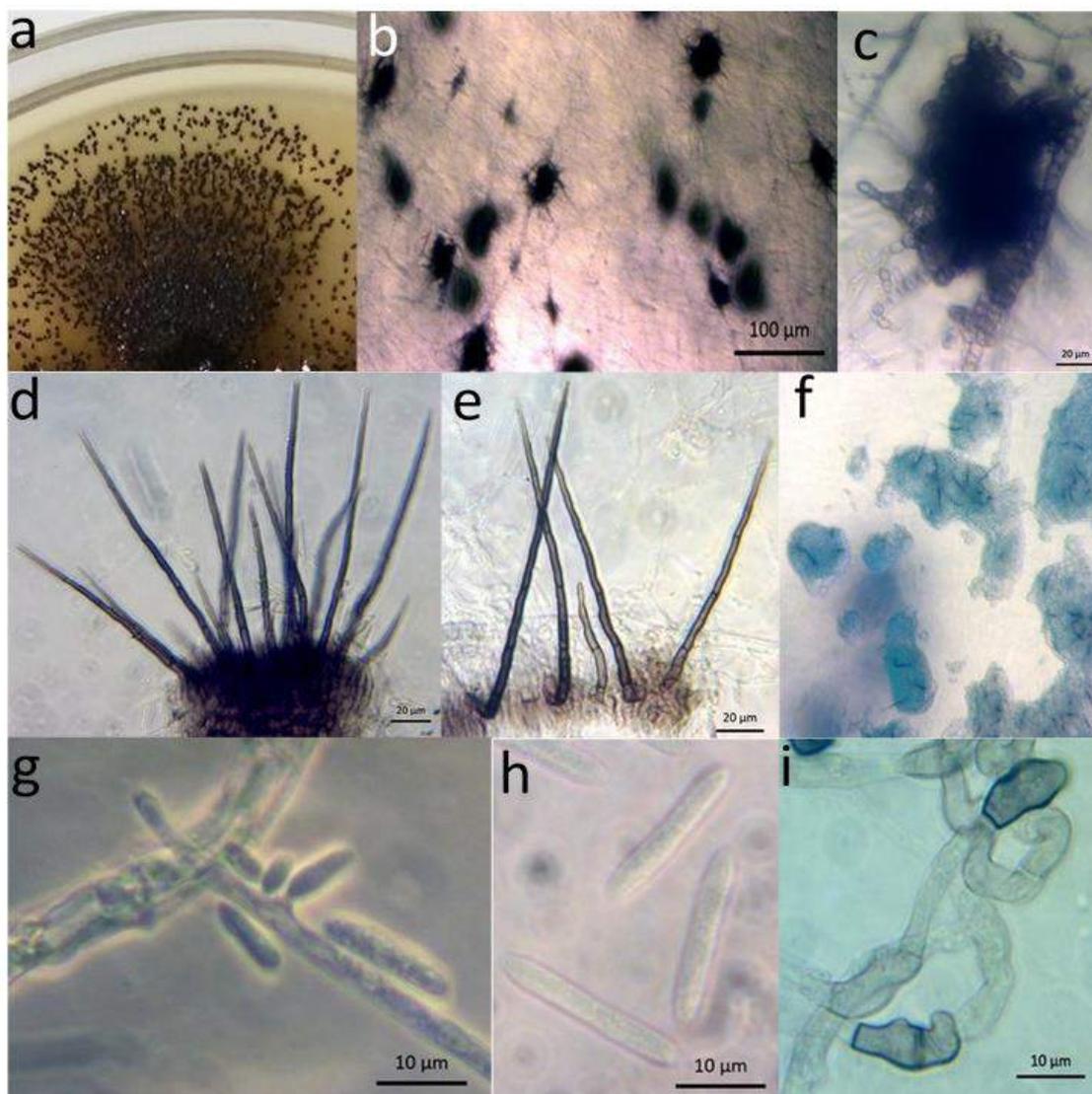


Figura 5. Estructuras de *Colletotrichum coccodes*. a) arreglo de microesclerocios; b) y c) microesclerocios; d) acérvulo; e) setas; f) acérvulos con conidios en masas; g) y h) conidios; i) apesorios.

3.3 Identificación del patógeno

Para reportar una identificación positiva de *C. coccodes*, es necesario la detección en conjunto de las siguientes pruebas: aislamiento y caracterización de la colonia y caracterización morfométrica de las estructuras distintivas del hongo. De manera opcional y complementaria, en el caso de que así se requiera: realizar el ensayo de PCR punto final con los primers Cspa1-Cspa2, enviar a secuenciar la región ITS (primers ITS1/ITS-4) y hacer análisis filogenético a partir de dichas secuencias (Anexo 8.6).

Los datos de secuenciación se deben de enviar al Laboratorio de Micología del CNRF para su análisis



4. REGISTROS

Almacenar los registros y evidencias del proceso de diagnóstico de *C. coccodes*.

- Mantener el material vegetal que no fue utilizado en el diagnóstico en su empaque original, bajo refrigeración a 4 °C durante al menos 1 mes posterior al diagnóstico.

En caso de obtener un resultado negativo:

- Inactivar y desechar el material vegetal.

En caso de obtener un resultado positivo:

- Desde el momento en que se detectan síntomas en hojas, prensarlas hasta que pierdan humedad y resguardarlas a temperatura ambiente.
- Para los frutos, colocar la cubierta del fruto que muestra los signos del hongo en viales de 2 ml y conservarla en congelación a -20 °C. La parte carnosa del fruto se desecha, previa inactivación.
- Conservar montajes permanentes, donde se encuentren estructuras distintivas del hongo como evidencia de la identificación morfológica.
- Conservar el aislamiento puro mediante técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo, no realizar transferencias continuas del aislamiento.
- Resguardar los resultados de las pruebas moleculares (fotografía del gel y secuencias).
- Mantener el DNA obtenido en congelación a -20 °C (de ser posible a -70 °C).

5. CONTACTO PARA INFORMACIÓN ADICIONAL

Correo: lab.micologia@senasica.gob.mx

Teléfono: 011 (52) 55 5905 1000, **Ext.** 51424, 51409 y 51373

6. RECONOCIMIENTO

Este protocolo fue elaborado por el Laboratorio de Micología (Adrián González Saucedo, Jire Ajeleth Muñoz Jaimes, Lervin Hernández Ramos, Magnolia Moreno Velázquez y Nayeli Carrillo Ortiz), revisado por el Departamento de Fitopatología (María del Rocío Hernández Hernández) y editado por el Grupo DiaFi (Ariana Guadalupe Robles Zárata y Lizeth Guadalupe Durán Espinosa).

Se agradece al personal del Área de Análisis de Riesgos de Plagas del CNRF, por la información proporcionada sobre el estatus fitosanitario utilizada para la elaboración del protocolo.



7. REFERENCIAS

- Andrivon, D., Lucas, J. M., Guérin, C. y Jouan, B. (1998). Colonization of roots stolons, tubers and stems of various potato (*Solanum tuberosum*) cultivars by the black-dot fungus *Colletotrichum coccodes*. *Plant Pathology*, 47, 440-445. doi: 10.1046/j.1365-3059.1998.00267.x.
- Anthracoise of Tomatoes. (s/f). En *Agrobases Canada*. Recuperado en junio de 2019 de <https://agrobasesapp.com/canada/disease/anthracnose-of-tomatoes-3>
- Ben, D., Zvi, B. y Tsrur, L. (2009). An improve large-scale screening method for assessment of *Colletotrichum coccodes* aggressiveness using mature green tomatoes. *Plant pathology*, 58, 497-503. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01989.x.
- Benson, A. D., Mark, C. K. C., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, J. D., Ostell, J. y Sayers, W. E. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41, 36-42. doi: 10.1093/nar/gks1195.
- Byrne, J. M., Hausbeck, M. K., Meloche, C. y Jarosz, A. M. (1998). Influence of dew period and temperature on foliar infection of greenhouse-grown tomato by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Disease*, 82, 639-641. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.6.639.
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R. y Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum*—current status and future directions. *Studies in mycology*, 73, 181-213. doi: 10.3114/sim0014.
- Cenis, L. J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20 (9), 2380. doi: 10.1093/nar/20.9.2380.
- Colletotrichum coccodes*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Diseases, No. October. (2011). En *Invasive Species Compendium (CABI/EPPO)*. Recuperado en junio de 2019 de <https://www.cabi.org/isc>
- Costa, M. H. D., Pfenning, L. H. y Pozza, E. A. (2006). *Colletotrichum coccodes*, patógeno de solanáceas no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*. 31 (3), maio-jun.
- Dillard, H. R. (1992). *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. En: Bailey J. A. y M. J. A, Jeger. (Eds.), *Colletotrichum. Biology, pathology and control*. (pp. 225–236). Wallingford. UK, C. A. B. International.
- Dillard, H. R. y Cobb, A. C. (1998). Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil. *Plant Disease*, 82 (2), 235–238. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.2.235.
- Gilardi, G., Colla, P., Pugliese, M., Baudino, M., Gullino, M. L. y Garibaldi, A. (2014). Control of *Colletotrichum coccodes* on tomato by Grafting and soil amendmets. *Journal of Phytopathology*, 162, 116–123. doi: 10.1111/jph.12162.
- Hughes, S. J. (1958). Revisiones Hyphomycetum aliquot cum appendice de no minibus rejiciendis. *Canadian. Journal of Botany*, 36 (6), 727-836. doi: 10.1139/b58-067.
- Jamiołkowska, A., Skwaryło, B. B. y Patkowska, E. (2018). Morphological identity and population structure of hemibiotrophic fungus *Colletotrichum coccodes* colonizing pepper plants. *Acta Scientiarum. Polonorum Hortorum Cultus*. 17 (4), 181-192. doi: 0.24326/asphc.2018.4.16.



- Kokko, E.- G. y Shoemaker, R. A. (1974). *Colletotrichum coccodes*. Fungi Canadiense. En: V. Robert, G. Stegehuis y J. Stalpers (Eds). *The MycoBank engine and related databases*. (1-2).
- Lees, A. K. y Hilton, A. J. (2003). Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. *Plant Pathology*, 52, 3-12. doi: 10.1046/j.1365-3059.2003.00793.x.
- Liu, F., Hyde, K. D., y Cai, L. (2011). Neotypification of *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of potato black dot disease and tomato anthracnose. *Mycology*, 2 (4), 248-254. doi: 10.1080/21501203.2011.600342.
- Módulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancías fitosanitarias de origen vegetal. (2019). En *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)*. Recuperado el 20 de junio de 2019 de <https://sistemasssl.senasica.gob.mx/mcrfi/>
- Pasche, J. S., Taylor, R. J. y Gudmestad, N. C. (2010). Colonization of potato by *Colletotrichum coccodes*: effect of soil infestation and seed tuber and foliar inoculation. *Plant Disease*, 94, 905-914. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-7-0905>.
- Pathogen of the month-june (2009). En *APPS*. Recuperado en junio de 2019 de <https://www.appsnet.org/Publications/potm/pdf/Jun09.pdf>
- Raid, R. N. y Pennypacker, S. P. (1987). Weeds as host for *Colletotrichum coccodes*. *Plant Disease*, 71, 643–646. doi: 10.1094/PD-71-0643.
- Saxena, A., Raghuwanshi, R., Gupta, V. K. y Singh, H. B. (2016). Chilli Anthracnose: The Epidemiology and Management. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1527. doi: 10.3389/fmicb.2016.01527.
- Than, P. P., Jeewon, R., Hyde, K. D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O. y Taylor, P. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, 57 (3), 562 – 572. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01782.x.
- Tozze, H. J. Jr., Gioria, R., Suzuki, O., Brunelli, K. R., Souza, B. R. y Sidnei, M. N. Jr. (2007). Natural occurrence of *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes causing anthracnose on pepper (*Capsicum annuum* L.) in Brazil. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 33 (4), 418. doi: 10.1590/S0100-54052007000400019.
- White, J. T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White (Eds), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. (315-322). San Diego, EE. UU. Academic Press. Inc.
- Young, K. J., Si, W. J, Ju, K. H. y Hwan, K. S. (2018). Molecular Markers for the Rapid Detection of *Colletotrichum coccodes*, an Anthracnose Pathogen of Tomato. *The Korean Journal of Mycology*, 46 (2), 186-192. doi: 10.4489/KJM.20180021.



Forma recomendada de citar:

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2019).
Protocolo de Diagnóstico: *Colletotrichum coccodes* (Antracnosis del tomate y chile)
[Versión 2.0]. Tecámac, México: Autor.

8. ANEXOS

8.1 Signos y síntomas

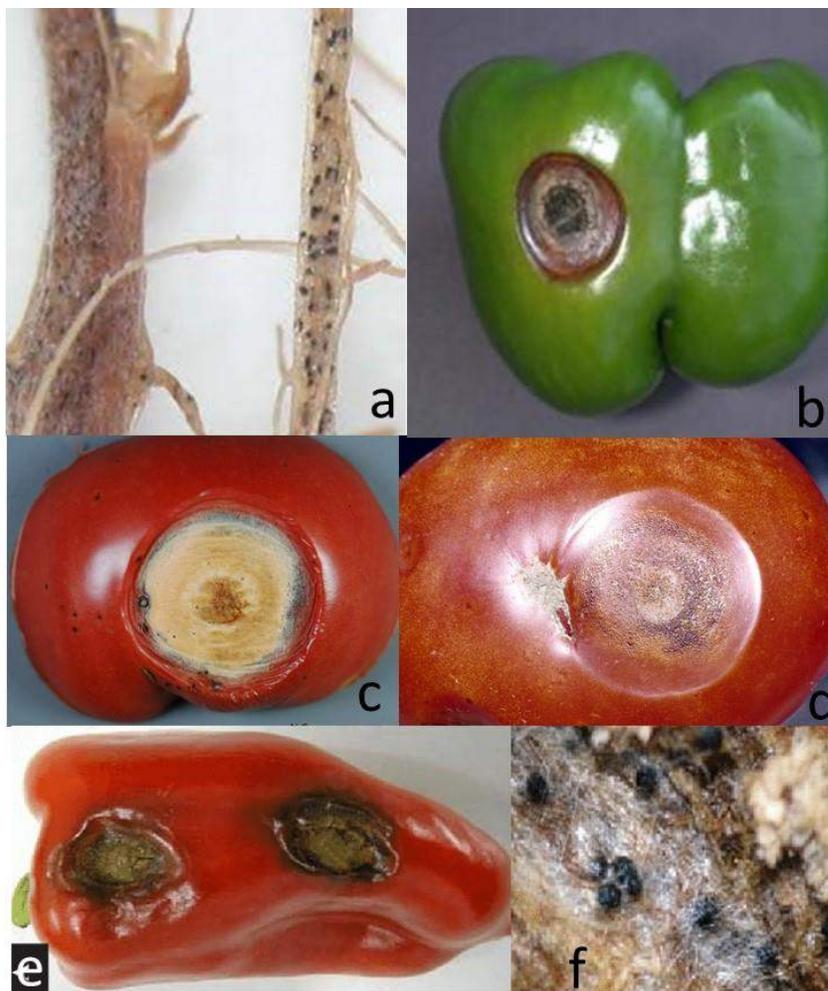


Figura 6. Síntomas causados por *Colletotrichum coccodes* en tomate y chile. a-d) tomate (*Solanum lycopersicum*); e-f) chile (*Capsicum annuum*) (Agrobase Canada s/f; APPS, 2009; Tozze et al., 2007).

8.2 Ciclo de la enfermedad

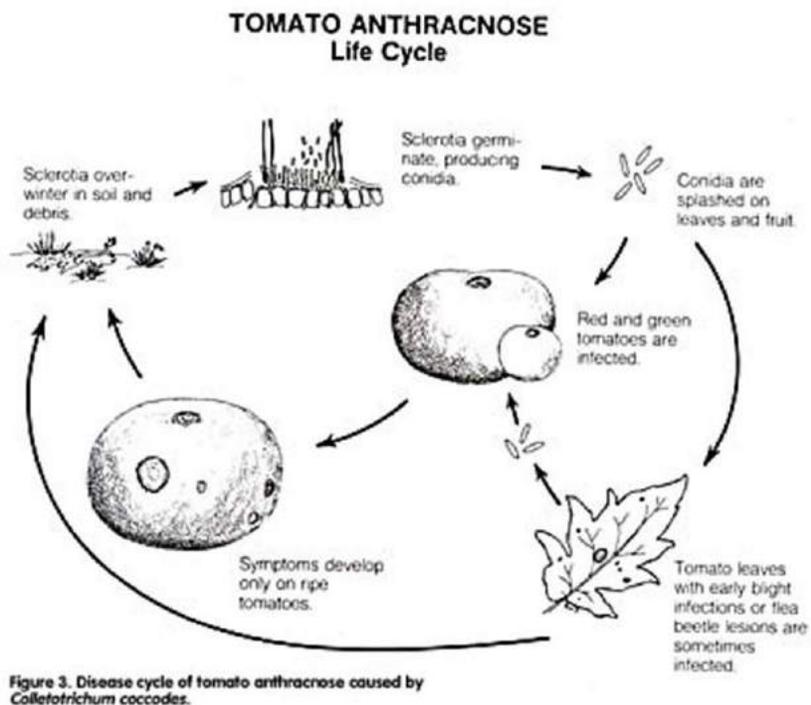
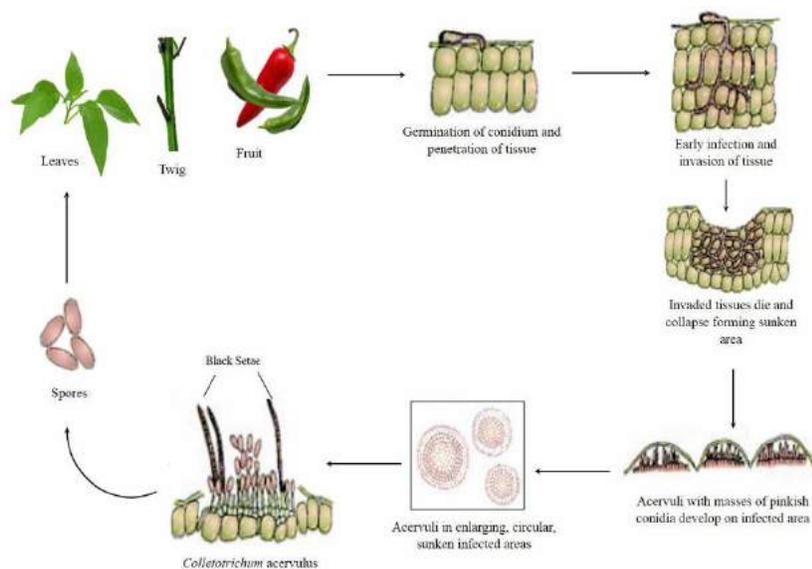


Figura 7. Ciclo de vida de *Colletotrichum coccodes* en tomate (*Solanum lycopersicum*).





8.3 Elaboración de montajes

8.3.1 Preparaciones temporales con cubreobjetos

Partir de tejido vegetal con signos del hongo, o de cultivos puros, colocar el tejido vegetal o estructuras en un portaobjeto o caja Petri de cristal y observar a detalle con un microscopio estereoscópico el área a seccionar o montar en laminillas.

Realizar cortes de material vegetal con estructuras del hongo, con navaja de bisturí o con navaja de afeitar, de un grosor menor a 0.2 mm o lo suficientemente delgado para dejar pasar la luz a través del tejido; también se puede tomar directamente un fragmento de micelio o las estructuras del hongo a partir de su cultivo o del tejido vegetal.

Colocar los cortes o estructuras del hongo sobre un portaobjetos con la ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Adicionar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4), hidratar completamente el tejido y evitar formación de burbujas de aire.

Cubrir la gota con un cubreobjetos y presionar ligeramente para que el líquido se distribuya y de ser necesario eliminar el excedente, secar con papel absorbente, cuidando que no se pierda el espécimen. Calentar por segundos (de 3 a 10 s) para eliminar burbujas de aire. Observar el espécimen en un microscopio compuesto. En caso de que no se aprecien las estructuras, debe realizarse otra preparación, cuidando que los cortes sean más finos.

8.3.2 Preparaciones temporales con cinta adhesiva

- 1) Colocar en un portaobjetos una gota de medio de montaje (Anexo 8.4).
- 2) Con un pedazo de cinta adhesiva transparente tocar delicada y superficialmente el área del tejido vegetal, o del medio de cultivo, con crecimiento de hongos para obtener las estructuras del mismo.
- 3) Pegar la cinta sobre el portaobjetos cuidando que las estructuras queden dentro de la gota.
- 4) Observar con un microscopio compuesto.

8.3.3 Preparaciones permanentes

- 1) Colocar una gota de medio de montaje (Anexo 8.4) sobre un portaobjetos.
- 2) Adicionar las estructuras del hongo dentro de la gota con ayuda de una aguja de disección o de un alfiler entomológico. Eliminar las burbujas que se formen con una aguja o calentado el portaobjetos.
- 3) Con ayuda de un sacabocados, formar un anillo de parafina alrededor de la gota. Para esto, calentar el extremo del sacabocados en un mechero e introducirlo en parafina sólida e inmediatamente colocarlo alrededor de la gota.

Nota: el diámetro del sacabocados debe ser mayor al de la gota.

- 4) Colocar un cubreobjetos sobre el anillo de parafina y calentar hasta que el anillo se derrita, cuidando que no queden burbujas de aire en la gota ni en la parafina.
- 5) Dejar enfriar y observar con un microscopio compuesto.

8.4 Medios de montaje

Cuadro 1. Medios de montaje recomendados

Medio de montaje	Reactivos	Procedimiento
Lactofenol	Fenol (cristales) 20 g	1) Agregar los cristales de fenol y el agua a un recipiente.
	Ácido láctico 20 mL	2) Calentar ligeramente para disolver los cristales, adicionar la glicerina y el ácido láctico.
	Glicerina 40 mL	3) Colocar una cantidad mínima de colorante y agitar hasta que se diluya
	Agua destilada 20 mL	4) Agregar colorante hasta obtener la coloración deseada.
Agua-glicerina	Azul de Nilo 0.1- 0.5 g	1) Mezclar 50 partes de agua destilada y 50 partes de glicerina
	Glicerina 50 mL	2) Se puede adicionar algún colorante como azul de Nilo.
	Agua destilada 50 mL	

Nota: el lactofenol actúa como solución fijadora y restaura la turgencia del material seco. Es excelente medio para montajes temporales y permanentes. El agua-glicerina se utiliza en montajes temporales y permanentes.

8.5 Medios de cultivo

A continuación, se señalan los medios de cultivo que permiten un óptimo desarrollo *in vitro* de *C. coccodes*.

Cuadro 2. Medios de cultivo recomendados

Medio de Cultivo	Ingredientes	Procedimiento
PDA (Papa-Dextrosa-Agar)	200 g Papa	1) Colocar en trozos la papa en un matraz Erlenmeyer con el agua y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min.
	20 g Dextrosa	2) Filtrar el agua de cocción y aforar a 1 L. Agregar el agar y la dextrosa. Esterilizar en autoclave a 121°C por 20 min.
	20 g Agar	3) Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar.
EMA (Malt Extract Agar- Extracto de Malta Agar)	1 L Agua destilada	
	33.6 g Extracto de malta	1) Mezclar los ingredientes en un matraz Erlenmeyer.
	agar	2) Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min.
OA (OatEMAI Agar-Harina de Avena Agar)	1 L Agua destilada	3) Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri, permitir la solidificación.
	40 g Hojuelas de avena	1) Remojar durante 8 h las hojuelas de avena, calentar y filtrar.
	15 g Bacto Agar	2) Mezclar con el resto de los ingredientes en un matraz Erlenmeyer.
	(agarosa granulada)	3) Esterilizar en autoclave a 121 °C por 20 min.
	1 L Agua destilada	4) Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y esperar hasta solidificar.



8.6 Corroboración molecular

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) permite la detección y amplificación de regiones específicas de ácidos nucleicos. Una vez obtenida la amplificación del ensayo del gen endógeno, mediante análisis de secuencias de la región ITS es posible diferenciar *C. coccodes*.

Nota: para la estandarización de este protocolo se utilizaron diversos reactivos y equipos, éstos se pueden reemplazar por otras marcas siempre y cuando sean homólogos y cumplan con la misma función.

8.6.1 Extracción de DNA

La extracción se debe realizar a partir de cultivos puros en medio PDA o EMA previamente caracterizados morfológicamente.

Nota: cualquier kit comercial de extracción de DNA puede resultar óptimo para tal fin, para ello es importante obtener una buena calidad, cantidad e integridad del DNA.

Se sugiere la metodología propuesta por Cenis (1992) modificada, la cual se describe a continuación:

- 1) En un tubo con perlas de cerámica (MagNA Lyser Green Beads 03358941001 de Roche) transferir 0.01 g de micelio de una caja Petri de la muestra de interés.

Nota: para facilitar la obtención de sobrenadante, previamente sustraer del tubo un poco menos de la mitad de las perlas de cerámica.

- 2) Agregar 500 µL de buffer TE 1X, incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, centrifugar 5 min a 17 940 g, extraer la mayor cantidad posible de sobrenadante con una micropipeta.

Nota: evitar decantar el buffer TE mediante inversión del tubo, ya que las perlas de cerámica y micelio se perderían también.

- 3) Adicionar 300 µL de buffer de extracción y macerar el micelio hasta que quede pulverizado usando un disruptor de tejidos durante 10 min (Minibeadbeater-96 Cat. No. 1001 de Biospect Products o equipos con características similares).

Nota: el buffer de extracción consiste en 200 mM Tris-HCL pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) y 0.5% SDS (Dodecil Sulfato de Sodio). Se recomienda agitar antes de usar.

- 4) Adicionar 150 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2, invertir suavemente dos a tres veces el tubo y posteriormente colocar los tubos en refrigeración a una temperatura de -20 °C durante 10 min.

- 5) Centrifugar los tubos durante 10 min a 15 290 g, transferir 250 μ L del sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo y estéril (evitar la resuspensión del sedimento).
- 6) Agregar 250 μ L de isopropanol frío (almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), invertir suavemente dos a tres veces el tubo y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 min; posteriormente, centrifugar 10 min a 15 290 g.

Nota: al final del proceso puede ser o no visible la pastilla de DNA.

- 7) Decantar el isopropanol por inversión cuidando de no perder la pastilla. Agregar 500 μ L de etanol al 70% y centrifugar durante 2 min a 15 290 g. Repetir el lavado con etanol al 70% una vez más. Secar la pastilla por inversión en papel secante estéril durante 3 horas o hasta que no se observen gotas en la pared del tubo.
- 8) Resuspender el DNA en 50 μ L de agua grado biología molecular o buffer TE 1X, y guardar la muestra en refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cantidad de DNA obtenida por este método debe ser la suficiente para cubrir el intervalo de trabajo del ensayo de PCR.

8.6.2 Verificación de la calidad del DNA

Al finalizar el proceso es importante verificar la calidad y cantidad del DNA obtenido; para ello se puede utilizar un espectrofotómetro modelo NanoDrop 2000c de Thermo Scientific™ (seguir las instrucciones del manual del fabricante para su uso) u otro equipo con la misma funcionalidad. La calidad óptima del DNA está dada por la absorbancia $A_{260/280} = 1.8-2.0$ y $A_{260/230} = 2.0-2.2$. Para corroborar que el DNA obtenido es apto para ser amplificado debe realizarse un ensayo de control endógeno, evitando así falsos negativos. En la práctica, absorbancias fuera de los intervalos óptimos son permitidos solamente cuando amplifiquen exitosamente el control endógeno.

8.6.3 PCR punto final

8.6.3.1 Ensayo control endógeno

Para verificar la calidad e integridad del DNA extraído, así como evitar falsos negativos, se debe realizar un ensayo de PCR de un control endógeno. Se utilizan los primers ITS-1 e ITS-4 propuestos por White et al. (1990), que reconocen regiones ribosomales conservadas (ITS rDNA). Las secuencias de los primers se observan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Primers utilizados en el ensayo de PCR punto final para la detección del gen endógeno

Tipo	Nombre del primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (pb)
Sentido	ITS-1	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	Aprox. 650
Antisentido	ITS-4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	



1) Preparar la reacción de PCR punto final de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Preparación de la mezcla de reacción para el ensayo de PCR punto final del control endógeno

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer PCR	10 X	1 X	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTP's	10 mM	0.2 mM	0.5
Primer Sentido	10 µM	0.5 µM	1.25
Primer Antisentido	10 µM	0.5 µM	1.25
Taq DNA Pol	500 U	2.5 U	0.125
DNA	25 – 500 ng/µL	2 – 40 ng/µL	2.0
Agua grado biología molecular	-	-	16.625
		Volumen final	25

2) A continuación, programar el termociclador de acuerdo con lo descrito en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Programa de termociclaje para la detección del control endógeno

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	45 s	
Alineamiento	58 °C	45 s	35
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	10 min	1

Los productos de PCR deben correrse durante 1 hora a 100 V en un gel de agarosa ultra pura al 2% en buffer TAE 1X, teñido con 0.6X de GelRed™ Biotum, u otro método adaptable que permita interpretar los resultados.

8.6.3.2 Controles para las pruebas moleculares

En el ensayo de PCR punto final descrito en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles:

Control positivo: provee un patrón de referencia con el cual comparar los resultados positivos en las muestras. Puede ser DNA genómico de cualquier especie de *Colletotrichum* que en un ensayo previo haya tenido una amplificación correcta.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin molde (DNA/RNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

8.6.4 Interpretación de resultados para los ensayos de PCR punto final

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios:

- En el ensayo de control endógeno, el control positivo (DNA) y cada una de las muestras debe generar una banda de tamaño de 650 pb (Figura 9).
- El control negativo de reactivos no debe generar bandas.

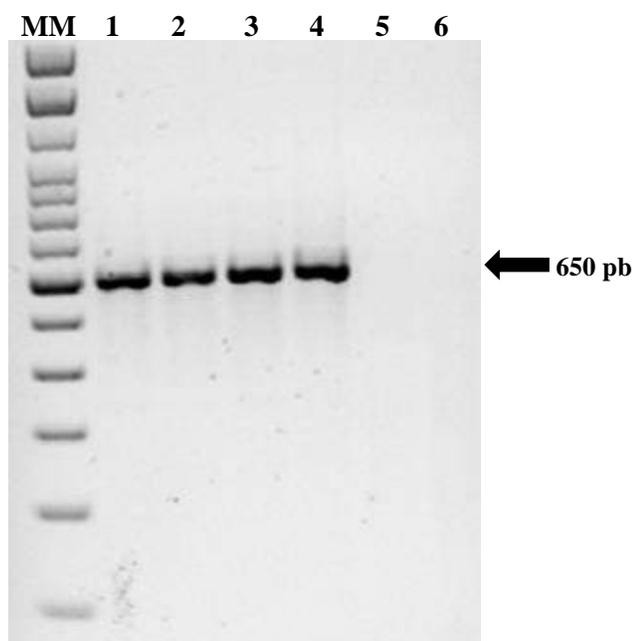


Figura 9. Ensayo de control endógeno con el par de primers ITS-1 e ITS-4. 1: control positivo de *Colletotrichum coccodes*; 2-4: muestras, 5-6: control negativo de reactivos. MM: marcador molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder de Invitrogen. Banda amplificada: 650 pb. Ensayo a partir de cultivos puros.

8.6.5 Corroboración mediante Filogenia Molecular

La identificación de *C. coccodes* a través de secuenciación y análisis filogenético es suficiente mediante el gen de la región ITS del rDNA, a pesar de que estudios publicados utilizan también el gen β -tubulina, el gen de actina (Act), el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), entre otros, lo que hace el análisis más robusto (Cannon et al., 2012). Sin embargo, con fines prácticos, el gen de la región ITS es suficiente para la identificación de *C. coccodes*. El Laboratorio de Micología del CNRF se basa en el análisis filogenético de la región ITS del rDNA amplificado con los primers ITS-1/ITS-4.

- 1) Los productos de PCR de la amplificación con los primers ITS-1/ITS-4 correspondientes a 650 pb aproximadamente deben enviarse a secuenciar, siguiendo las especificaciones para el envío de muestras de la institución a la que se solicite el servicio.
- 2) Cuando las secuencias hayan sido recibidas, ingresar a la herramienta de alineamiento Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for

Biotechnology Information) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e insertar la secuencia de interés (tanto forward como revers) y realizar el alineamiento con los parámetros predeterminados.

Nota: tomando como referencia la accesión HM171679, el segmento mínimo necesario abarca del nucleótido 75 al 541.

- 3) Una vez realizado el alineamiento (Figura 10) revisar cuidadosamente el porcentaje de cobertura e identidad (los porcentajes siempre deben tender hacia el 100%) de las especies que aparecen en la parte superior de la tabla. Verificar el valor de E, el cual, representa el valor estadístico generado por BLAST a partir del alineamiento al azar de la secuencia de interés en la base de datos, dicho valor siempre debe tender a cero (Benson et al., 2013); también revisar el responsable de las secuencias depositadas. Es importante mencionar que en esta base de datos existen muchas secuencias que han sido incorrectamente identificadas, por lo que el resultado obtenido (aún con 100% de cobertura e identidad) en ocasiones no resulta totalmente concluyente.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum coccodes isolate RB302 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal	863	863	100%	0.0	100.00%	MK531998.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum coccodes isolate SF40 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr	863	863	100%	0.0	100.00%	MK271328.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum coccodes isolate SF24 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr	863	863	100%	0.0	100.00%	MK271317.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum coccodes isolate SF23 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr	863	863	100%	0.0	100.00%	MK271316.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum coccodes isolate SF21 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tr	863	863	100%	0.0	100.00%	MK271314.1
<input type="checkbox"/>	Colletotrichum coccodes isolate PB4 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal tra	863	863	100%	0.0	100.00%	MG881796.1

Figura 10. Alineamiento de secuencias utilizando Nucleotide BLAST de una muestra sospechosa a *Colletotrichum coccodes*.

En el banco de secuencias se encuentran disponibles más de 100 especies del género *Colletotrichum* que hacen posible determinar mediante un análisis filogenético con un 100 % de exactitud la identidad de *C. coccodes*.

Dado que en grupos de especies con un alto grado de parentesco molecular la diferenciación entre especies, formas especiales o razas reside en un número limitado de inserciones y deleciones (INDELS) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), es conveniente realizar un análisis filogenético para determinar con exactitud la identidad de las muestras de interés. La reconstrucción filogenética debe partir de secuencias bien caracterizadas de especies tipo y procedentes de una fuente fiable, se recomienda utilizar las secuencias de referencia publicadas por Cannon et al. (2012) y Liu et al. (2011) para la región ITS rDNA; a ellas se deben agregar las secuencias de la muestra de interés.

Nota: las secuencias de referencias para *C. coccodes* son: HM171679, HM171678 y GQ485588 (Figura 11).



- 4) El alineamiento múltiple de secuencias y la posterior construcción de árboles filogenéticos se realizan con los Softwares BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.5 y MEGA7, (otros softwares pueden ser utilizados para el mismo propósito).

En el alineamiento múltiple de secuencias incluir tanto la secuencia del primer forward como del primer reverse en su reverso complementario, utilizar el algoritmo ClustalW para el alineamiento de todas las secuencias. Para la reconstrucción filogenética es recomendable utilizar un método que esté basado en distancias génicas (Neighbor-joining NJ) y otro que esté basado en métodos probabilísticos (Maximum likelihood o inferencia Bayesiana).

- 5) El árbol filogenético obtenido puede ser confirmado mediante el análisis de los INDELS y SNPs observados directamente en el alineamiento múltiple de secuencias (Figura 10). Para ejemplificar, la secuencia de la muestra de interés fue analizada mediante el método de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood), donde, a pesar de haber quedado agrupada junto con las secuencias de referencia de las especies del complejo *spaethianum* (*C. lili*, *C. liriopes*, *C. spaethianum*, *C. tofieldiae* y *C. verruculosum*) se puede apreciar su separación; resultado que confirma la identidad de *C. coccodes* (Figura 12).

8.6.5.1 Interpretación de resultados

El resultado es positivo cuando la secuencia de la muestra quede agrupada exactamente en el mismo clado que las secuencias de referencia HM171679, HM171678 y GQ485588.

El resultado es negativo cuando las secuencias de la muestra queden agrupadas en un clado distinto a las de las secuencias de referencia. En este caso la identidad del organismo es establecida con base en el clado que se agrupe la secuencia de la muestra y debe registrarse en el resultado final.

El resultado final debe estar basado en conjunto con lo observado en la caracterización morfológica, y la secuenciación y filogenia molecular.

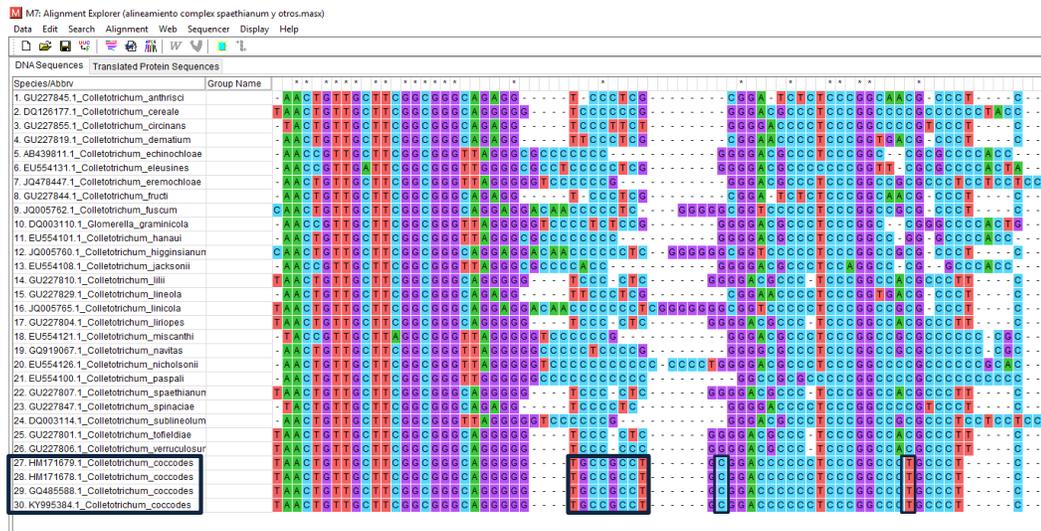


Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias. Se utilizaron las secuencias de la región ITS rDNA de 30 registros pertenecientes a especies del género *Colletotrichum* utilizando el algoritmo ClustalW. Obsérvese los INDELS y SNP's característicos de *C. coccodes* en una región parcial de la región amplificada por los primers ITS-1 e ITS-4.

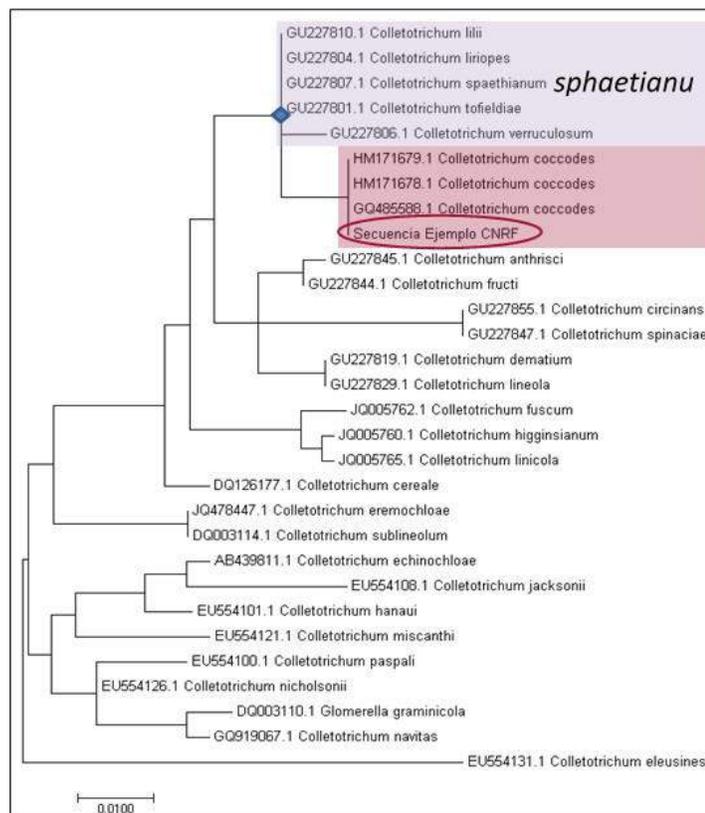


Figura 12. Filogenia molecular. Inferida de una porción de la región ITS rDNA mediante el Modelo de Máxima Verosimilitud (Maximum likelihood) con 1000 réplicas soporte (Bootstrap) incluyendo 29 secuencias de 27 especies del género *Colletotrichum* más la muestra denominada aislamiento CNRF.