



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA ANTRACNOSIS DEL
PALTO**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de
Magíster en Ciencias Agropecuarias

YSADORA FERNANDEZ RODRIGUEZ

Director de Tesis
JOSE LUIS HENRIQUEZ SAEZ

Profesores consejeros
THOMAS FICHET LAGOS
ALAN ZAMORANO CARRASCO

SANTIAGO – CHILE
2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS DE LA ANTRACNOSIS DEL PALTO

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de
Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en
Ciencias Agropecuarias

YSADORA FERNANDEZ RODRIGUEZ

	Calificaciones
DIRECTOR DE TESIS	
José Luis Henríquez S.	7,0
Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph.D.	
PROFESOR CONSEJERO	
Thomas Fichet L.	6,8
Ingeniero Agrónomo, Dr.	
Alan Zamorano C.	7,0
Bioquímico, Dr.	

Santiago, Chile
2021

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar haciendo hincapié a que esta será una larga lista, porque sí, a lo largo de mi estadía en esta universidad me he topado con una cantidad enorme de personas que han hecho este momento posible. También quiero confesar que espere llegar a escribir los agradecimientos por mucho tiempo, porque sentía que era en aquel punto en el que podría decir “lo conseguí” así que mientras escribo caóticamente, algo que me ha caracterizado de por vida, intento plasmar el torbellino de emociones que se arma en mi cabeza. Y es que si me han conocido sabrán que la tímida “Ysa” quedo sepultada hace un tiempo atrás, con la ayuda de todos ustedes. Así es como primeramente quiero agradecer a mi familia, mis padres, Ruth y Nelson, a ellos por enseñarme que debo seguir mis sueños cueste lo que cueste, a su apoyo y amor incondicional el cual siempre me han brindado. A mi querida hermana, por ser mi segunda mamá, apoyo y consejera, por estar tras de mi cada vez que un momento difícil me atormenta y por ser ese ejemplo de mujer al que aspiro ser cada día. Agradezco también a Daniel, por ser mi alegría, mis sonrisas, mi amigo, sobrino, para que sepa que, si su tía pudo, el también podrá, para que jamás ponga límite a sus sueños. A Rebeca, por su apoyo y amor a distancia, que siempre fueron una luz y guía ante mi truncado camino. Y a Maca por estar en cada una de mis aventuras, intentando entenderme y apoyar cada una de mis decisiones, por ser una hermana más y entrañable amiga.

Por otra parte, quiero agradecer a todas esas personas con las que la vida me premió encontrarme, quiero comenzar con mi queridísimo amigo Marcelo, otro ejemplo a seguir, quien me contagió su amor por la fitopatología y la investigación. A Claudio, quien se volvió mi hermano en el camino, que se empeñó en enseñarle a este simio de laboratorio la rigurosidad y quien siempre trae un desafío que me permite aprender un poquito más. A mi profesor guía José Luís Henríquez, por creer en mí, algo que pocos hicieron a lo largo de la carrera, por hacer la fitopatología algo entretenido y fascinante. A mis popunerds, que pese a que me quede en el camino jamás dejaron de creer que lo lograría, a Dani y Sara, por su amistad, apoyo y por ser parte de ese equipo que siempre me sostiene

Finalmente, a Dios, por ponerme en el camino todas estas bellas personas y no dejar que me perdiera para al fin pisar la meta.

A todos, gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
Antracnosis del palto	8
Epidemiología de la antracnosis	8
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Ubicación del estudio	12
Material biológico	12
Evaluación de la adherencia de conidias a una superficie hidrofóbica	13
Determinación del tiempo de agua libre necesario para la germinación de conidias y formación de estructuras de infección	13
Determinación de patogenicidad de distintas especies de <i>Colletotrichum</i> sobre hojas. ...	14
Determinación de patogenicidad de distintas especies de <i>Colletotrichum</i> sobre frutos ...	14
Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial de distintas especies de <i>Colletotrichum</i>	15
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
RESULTADOS	16
Evaluación de adherencia de las conidias a una superficie hidrofóbica	16
Determinación del tiempo de agua libre necesario para la germinación de conidias y formación de estructuras de infección	19
Ensayos <i>in vitro</i> sobre una superficie hidrofóbica	19
Germinación de conidias sobre una superficie hidrofóbica	20
Formación de apresorios sobre una superficie hidrofóbica	22
Ensayos <i>in vivo</i> sobre hojas de palto	24
Germinación de conidias sobre hojas de palto	24
Formación de apresorios en hojas de palto	26

Pruebas de patogenicidad sobre hojas de palto.....	27
Pruebas de patogenicidad sobre frutos de palto.....	29
Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar.....	30
DISCUSIÓN	33
Evaluación de la adherencia de las conidias a una superficie hidrofóbica	33
Determinación del tiempo de agua libre necesario para la germinación de conidias y formación de estructuras de infección <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	36
Pruebas de patogenicidad sobre hojas y frutos de palto	39
Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar.....	42
CONCLUSIONES	44
LITERATURA CITADA	45
APÉNDICES	52

RESUMEN

En Chile, la epidemiología de la enfermedad conocida como la antracnosis del palto, causada por hongos del género *Colletotrichum*, no ha sido estudiada. Recientemente 10 especies de este género fueron identificadas en huertos de las Regiones Metropolitana, O'Higgins y Valparaíso, con distintas frecuencias poblacionales dependiendo del campo. Esta tesis se enfocó en el estudio de la relación entre aspectos epidemiológicos y la prevalencia de las especies en el campo. Para ello se seleccionaron las especies con mayor frecuencia (*C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. gloeosporioides*) y las especies con menor frecuencia (*C. sp.*, *C. fructicola* y *C. beeveri*). Los objetivos de este estudio fueron: (i) Establecer el tiempo de agua libre necesario para el desarrollo de distintas especies de *Colletotrichum* a través del estudio de los parámetros epidemiológicos adherencia y germinación de conidias, y formación de estructuras de infección, (ii) determinar diferencias en patogenicidad y virulencia de las especies de *Colletotrichum* en hojas y (ii) determinar y comparar las temperaturas de crecimiento óptimas, de las distintas especies de *Colletotrichum*. Los resultados obtenidos mostraron que la formación de estructuras de infección en todas las especies evaluadas de *Colletotrichum* depende del tiempo de agua libre, con un tiempo mínimo de 4 horas en todos los casos. Las especies *C. cigarro* y *C. pyricola* presentaron la mayor virulencia en hojas y frutos, respectivamente. Se detectó que *C. fructicola* y *C. beeveri* son incapaces de producir infección en hojas. Las especies presentan temperaturas óptimas de desarrollo entre los 18 y 23,8°C. *C. pyricola* es la especie con la menor temperatura de desarrollo, mientras que *C. fructicola* es tolerante a altas temperaturas.

ABSTRACT

The epidemiology of anthracnose of avocados, caused by *Colletotrichum* species, has not been studied in Chile. Recently, ten species have been identified causing avocado anthracnose on commercial orchards of Metropolitan, O'Higgins and Valparaíso Regions, where a survey found differences in the frequency of species. This study related epidemiological parameters with the prevalence of the species in the orchard. Three species with high frequency (*C. cigarro*, *C. pyricola* and *C. gloeosporioides*) and three species with low frequency (*C. sp.*, *C. fructicola* and *C. beeveri*) were studied. The objectives of this study were: (i) to establish the requirement of time of free water for the development of infection structures (ii) to determine differences in the pathogenicity and virulence of the species on fruit and leaves (iii) to determine and analyze minimum, optimum and maximum growth temperatures. Results showed that development of infection structures in all species of *Colletotrichum* depends on free water, with a minimum time of 4 hours. *C. cigarro* and *C. pyricola* were the most virulent in leaves and fruits, respectively. *C. fructicola* and *C. beeveri* did not infect leaves. The studied species had optimum temperatures of growth from 18 to 23,8°C. *C. pyricola* grew at the lowest temperature, while *C. fructicola* was the most tolerant to high temperatures.

INTRODUCCIÓN

Antracnosis del palto

La antracnosis causada por hongos del género *Colletotrichum*, es uno de los principales problemas fitopatológicos del palto, esta enfermedad se caracteriza por la presencia de lesiones necróticas y profusas que se desarrollan en flores, hojas, brotes y frutos. (Fitzell, 1987; Nelson, 2008; Silva *et al.*, 2017; Latorre, 2018). En brotes y ramillas puede causar muerte regresiva mientras que en frutos jóvenes pueden provocar la abscisión debido a la maduración prematura causada por la infección. Por su parte, en frutos maduros presenta comúnmente periodos prolongados de quiescencia por lo que esta enfermedad se desarrolla principalmente en la postcosecha (Agrios, 2005; Nelson, 2008). Dada la distancia a los mercados de destino, la palta debe ser transportada por periodos de almacenaje que varían entre los 5 a 60 días (Defilippi *et al.*, 2015) tiempo suficiente para que se desarrolle la enfermedad provocando pérdidas que pueden comprometer entre un 20 y un 40% de la producción total de la temporada (Fitzell, 1987; Xoca-Orosco *et al.*, 2017).

La sintomatología en frutos maduros inicia con la formación de lesiones pequeñas, oscuras y circulares que se desarrollan sobre la superficie del fruto (Apéndice 1), las cuales crecen rápidamente y con el tiempo se deprimen y ablandan, lo que provoca que la pulpa de la fruta se separe de la cascara, generando cavidades dentro del fruto infectado (Nelson, 2008; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020; Siddiqui y Ali, 2014). En condiciones de humedad, desde el centro de las lesiones se desarrollan acérvulos, estructuras reproductivas de origen asexual, subepidérmicas y cerosas. Es en estas estructuras en donde se formarán esporas asexuales conocidas como conidias, las cuales son los principales propágulos de diseminación del patógeno en el campo (Apéndice 2) (Nelson, 2008; Siddiqui y Ali, 2014; Sharma *et al.*, 2017). Los acérvulos tienden a desarrollarse profusamente en la superficie del tejido afectado y al madurar exudan masas de conidias con tonalidades que varían frecuentemente desde el rosado al anaranjado (Nelson *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2017; Latorre, 2018).

En cuanto a la taxonomía de *Colletotrichum*, se han definido 14 complejos, con un total de 248 especies, además de 23 especies no asociadas a ninguno de estos complejos (Cannon *et al.*, 2012; Jayawardena *et al.*, 2016; Bhunjun *et al.*, 2021). En el palto, a nivel mundial, la enfermedad se ha relacionado con especies pertenecientes a 6 complejos (Apéndice 3). En Chile, estudios recientes utilizando regiones parciales de los genes *ITS*, *GS*, *GAPDH*, y *TUB2*, identificaron la presencia de las especies: *C. beeveri*, *C. brassicicola*, *C. cigarro*, *C. fructicola*, *C. gloesporioides*, *C. jiangxiense*, *C. karstii*, *C. perseae*, *C. pyricola* y *C. sp.* En donde *C. cigarro* correspondió a la especie más abundante, seguida por *C. pyricola*, *C. gloesporioides* y *C. jiangxiense*, mientras que dentro de las menos frecuentes se encontró a *C. sp.*, *C. fructicola*, *C. beeveri* y *C. perseae* (Bustamante, 2019). Esta investigación, permitió evidenciar la alta diversidad de especies de *Colletotrichum* presentes en huertos de paltos en Chile, además de sugerir la prevalencia de ciertas especies sobre otras.

Epidemiología de la antracnosis

Los hongos del género *Colletotrichum* han sido clasificados según su estilo de vida como hemibiotrofos, caracterizada por una primera etapa en la cual el hongo adquiere los nutrientes necesarios para subsistir en el tejido vegetal sin alterar las células del hospedero, por lo que no se presentan síntomas de la enfermedad (Lopes *et al.*, 2020). Posterior a esta infección inicial, el patógeno comienza la colonización de las células de la planta, secretando un arsenal de enzimas y toxinas que le permitirán modificar el tejido del hospedero, provocando la muerte celular (Barimani *et al.*, 2013; Da silva *et al.*, 2020). En frutos, dependiendo del periodo de infección, entra en un periodo de quiescencia, antes de dar paso a la fase necrotrófica (Prusky *et al.*, 2013).

Para que se inicie la infección, las conidias deben asentarse en el fruto, este periodo depende de tres procesos claves: La adhesión de las conidias, su germinación y la formación de apresorios en el tejido del hospedero (Apéndice 4) (El-Akhal *et al.*, 2013). La adhesión corresponde a la fijación de la conidia a la superficie del fruto, la cual se lleva a cabo gracias a una capa fibrilar preformada que recubre las conidias, compuesta principalmente por glicoproteínas (Rawlings *et al.*, 2007). Sin embargo, también se ha observado la producción *de novo* de esta matrix extracelular, posterior a la fijación inicial, por lo que se habla de adherencia en dos (Sela-Burlage *et al.*, 1991; Mercure *et al.*, 1994a; Rawlings *et al.*, 2007). Independiente cual sea el caso, la hidrofobicidad y la rigidez de la superficie se han determinado como factores claves en la adherencia y posterior señalización que desencadena en la ruptura de la latencia de las conidias (Mercure *et al.*, 1994b; Rawlings *et al.*, 2007). Tras la adhesión, la conidia comienza a germinar, proceso en el cual emerge desde uno de los extremos de la conidia el denominado tubo germinativo, o primera hifa, que con su desarrollo estrecha el contacto entre el hospedero y el patógeno (Podila *et al.*, 1993; Agrios, 2005). Una vez que cesa la elongación del tubo germinativo, comienza la diferenciación de una hifa modificada, con forma de domo y de paredes celulares melanizadas, conocida como apresorio. En la base del apresorio se forma la hifa de infección, estructura que se encarga de atravesar la cutícula ayudada a través de la alta presión de turgencia producida dentro del apresorio, causada por la acumulación de glicerol. Este proceso también es mediado con la producción de cutinasas que facilitan la modificación de la superficie del fruto. Así, y de forma paulatina, las estructuras de infección profundizan en la cutícula y bajo esta (Apéndice 5) (Perfect *et al.*, 1999; Kubo y Takano, 2013). Tras establecerse en el tejido del hospedero, el hongo entra en latencia en la zona subcuticular, hasta el aumento de la madurez del fruto y la disminución de compuestos inhibitorios, momento en que inicia la formación de vesículas de infección, hifas primarias y secundarias, estructuras que median el avance de la infección hacia las células epidermales, iniciándose la fase necrotrófica (Perfect *et al.*, 1999; Wharton y Schilder, 2008; Sharon *et al.*, 2008).

Estos procesos previos a la infección por *Colletotrichum* dependen de factores ambientales como alta humedad, exposición en el tiempo a una película de agua y la temperatura, los cuales favorecen las infecciones y el desarrollo de la enfermedad (Silva y Michereff, 2013). Estudios previos han demostrado que el agua es crucial no sólo para la dispersión, sino que también para la fisiología de la conidia y su activación; la presencia de alta humedad relativa y una película de agua (agua libre) son requeridas para la formación del tubo germinativo y el apresorio (Hartung *et al.*, 1981; Dodd *et al.*, 1991; Estrada *et al.*, 2000; Kenny *et al.*, 2012). Interesantemente, existen reportes que describen la variabilidad en el comportamiento entre diferentes especies frente a las mismas condiciones de agua libre. Kenny *et al.* (2012),

reportaron que en presencia de agua libre y con una humedad relativa de un 100% el porcentaje de germinación de las conidias de *C. acutatum* fue de un 60%, mientras que para las conidias de *C. gloeosporioides* el porcentaje fue cercano al 90%. Además, en este estudio se presentó una baja en la germinación para ambas especies frente al mismo porcentaje de humedad relativa en ausencia de una película de agua, lo que establece la importancia de la presencia de agua libre para la germinación.

Otro factor clave es la temperatura, por lo que diversas investigaciones se han centrado en establecer las temperaturas óptimas de germinación entre las especies de este género (Hartung *et al.*, 1980; Kenny *et al.*, 2012), observándose que para el caso de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fructicola*, las temperaturas óptimas de germinación fluctúan entre los 20 y 30°C (Estrada *et al.*, 2000; Kenny *et al.*, 2012; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018). Aun cuando las condiciones óptimas necesarias para que se establezca la infección y mantener el posterior crecimiento y desarrollo del hongo, son equivalentes entre especies, los rangos de temperatura máximas son variables y se ha sugerido que se relacionan con la adaptación geográfica de las especies (Kenny *et al.*, 20012). Por ejemplo, Han *et al.* (2016), observaron cómo diferentes especies de *Colletotrichum* aisladas de frutilla (*Fragaria* × *ananassa*) cultivadas en distintas localidades de China, presentaban diferencias en sus temperaturas máximas de desarrollo y crecimiento. Las especies *C. gloeosporioides*, *C. aenigma* y *C. fructicola* resultaron ser más tolerantes a altas temperaturas, mientras que aislados de la especie *C. nymphaeae*, provenientes de sectores ubicados a una mayor altitud y menores temperaturas, presentaron una mayor sensibilidad a las altas temperaturas. Por lo que existe evidencia de que la distribución geográfica de las diferentes especies depende de este factor.

Por otra parte, se ha reportado que las especies de *Colletotrichum* presentan diferencias en su patogenicidad en frutillas. Han *et al.* (2016), determinaron que, de las cinco especies encontradas en China, *C. fructicola* y *C. murrayae* presentaban una mayor agresividad. Por su parte, Mayorquin *et al.* (2019), observaron que en limones inoculados con *C. karstii* el diámetro de la lesión era significativamente mayor, respecto a otras especies. En esta misma línea, en frutos de palto Shartma *et al.* (2017), determinaron que *C. aenigma*, de las 9 especies encontradas en Israel, correspondió al patógeno que presentó una mayor virulencia.

Para el caso del palto en Chile, observaciones en campo indican que las infecciones comienzan de manera temprana en el huerto y avanzan a medida que el fruto se desarrolla. Así como son favorecidas bajo condiciones de humedad, por lo que en sectores costeros existe una alta incidencia de la enfermedad. Sin embargo, el conocimiento epidemiológico en el país es prácticamente nulo. Mientras que, la abundancia diferencial de especies recientemente reportadas por Bustamante (2019), sugiere que existen diferencias epidemiológicas entre estas especies (germinación, temperaturas de desarrollo y patogenicidad, por ejemplo) en coherencia con lo reportado para especies de *Colletotrichum* en palto en otras regiones del mundo y en otros hospederos. Por ello, en esta tesis se propone el estudio de parámetros epidemiológicos, que podrían explicar la diferencia de distribución de las especies de *Colletotrichum* presentes en el país, además de entregar información valiosa en la comprensión de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Las diferentes especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en el palto en Chile poseen comportamientos biológicos y epidemiológicos diferentes que determinan la prevalencia de una especie sobre otra.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar a nivel de especie, diferencias entre parámetros epidemiológicos de aislados de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en paltas.

Objetivos específicos

1. Establecer el tiempo de agua libre necesario para el desarrollo de distintas especies de *Colletotrichum* a través del estudio de los parámetros epidemiológicos adherencia y germinación de conidias, y formación de estructuras de infección.
2. Determinar diferencias en patogenicidad y virulencia en frutos y hojas de palto de las especies de *Colletotrichum* estudiadas.
3. Determinar y comparar las temperaturas de crecimiento óptimas, máximas y mínimas de distintas especies de *Colletotrichum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio

El presente estudio se llevó a cabo durante la temporada 2019/20, en el Laboratorio de Fitopatología Postcosecha, perteneciente al Departamento de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicado en la comuna de La Pintana, Región Metropolitana.

Material biológico

Los aislados de *Colletotrichum* utilizados pertenecen al cepario del Laboratorio de Fitopatología Postcosecha, los cuales fueron obtenidos de frutos sintomáticos provenientes de huertos comerciales de la variedad Hass, ubicados en las Regiones de Valparaíso, Metropolitana y O'Higgins, y de fruta colectada en supermercados de la Región Metropolitana durante la temporada 2018. Se seleccionaron aislados de las especies más frecuentes (*C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. gloeosporioides*) y de las de menor frecuencia (*C. sp.*, *C. beeveri* y *C. fructicola*), utilizando dos aislados en aquellas especies que poseían más de una cepa (Cuadro 1).

Las hojas para el estudio de patogenicidad fueron colectadas del huerto docente perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, mientras que los frutos utilizados para realizar los estudios de patogenicidad y virulencia fueron colectados de un huerto comercial con una baja incidencia de antracnosis, ubicado en la comuna de Llay-Llay, en la provincia de San Felipe de Aconcagua en la Región de Valparaíso.

Cuadro 1. Aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en paltas analizados en este estudio y su localidad de origen.

Aislado	Especie	Origen
SDO1	<i>C. cigarro</i>	Santo Domingo, Región de Valparaíso
NAL42	<i>C. cigarro</i>	Isla de Maipo, Región Metropolitana
FAM20	<i>C. pyricola</i>	Isla de Maipo, Región Metropolitana
PEU2	<i>C. pyricola</i>	Peumo, Región de O'Higgins
FAM7	<i>C. gloeosporioides</i>	Isla de Maipo, Región Metropolitana
MER7	<i>C. gloeosporioides</i>	Localidad desconocida, Chile
NAL53	<i>C. sp.</i>	Isla de Maipo, Región Metropolitana
NAL54	<i>C. sp.</i>	Isla de Maipo, Región Metropolitana
NAL17	<i>C. beeveri</i>	Isla de Maipo, Región Metropolitana
MER6	<i>C. fructicola</i>	Localidad desconocida, Chile

Evaluación de la adherencia de conidias a una superficie hidrofóbica

Se utilizó uno o dos aislados de cada especie (Cuadro 1), los que se cultivaron durante 7 días en medio de cultivo CYE (casitona 1,7 g·L⁻¹, extracto de levadura 0,35 g·L⁻¹, glucosa 2,0 g·L⁻¹, agar 15 g·L⁻¹) para inducir la formación de acérvulos y conidias. Del cultivo obtenido, se preparó una suspensión de 10⁴ conidias·mL⁻¹, ajustada utilizando una cámara de Neubauer, para posteriormente sembrar una alícuota de 10 µL en el centro de placas de poliestireno transparente. El margen de la alícuota se marcó con un plumón. Las placas se incubaron cerradas por 1, 5, 10, 15 y 30 minutos en una cámara de cultivo a 20 °C, luego fueron lavadas con 20 mL de agua destilada estéril y agitadas por 40 segundos utilizando un vortex (ZX3 Advanced Vortex Mixer, VELP) a 8.000 RPM. Los 20 mL se descartaron y las placas lavadas fueron observadas en un microscopio de contraste de fase (Carl Zeiss, Alemania), bajo el cual se contabilizaron las conidias adheridas a la superficie. El número de conidias en una alícuota de 10 µL se consideró como 100% (promedio de seis repeticiones). Entonces, se estableció el porcentaje de adherencia en cada tiempo evaluado para cada especie.

El experimento tuvo una réplica biológica y se realizó bajo un diseño completamente al azar con estructura factorial (5×6) en donde la unidad experimental fue un grupo de aproximadamente 100 conidias. Los porcentajes obtenidos para aquellas especies con dos aislados fueron promediados. El factor tiempo estuvo constituido por 5 niveles mientras que el factor especie por 6 niveles. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y cada repetición consistió en una placa.

Determinación del tiempo de agua libre necesario para la germinación de conidias y formación de estructuras de infección

Este estudio se realizó con experimentos *in vitro* e *in vivo*. Para el primero, placas Petri de poliestireno transparente de 100 mm de diámetro, fueron inundadas con 20 mL de agua destilada estéril e inoculadas con una alícuota de 10 µL de una suspensión conidial (10⁴ conidias·mL⁻¹) de los distintos aislados a evaluar. Las placas fueron incubadas a 20°C por 2, 4, 8, 16 y 24 horas, y luego se visualizó y cuantificó la formación de estructuras bajo un microscopio óptico de contraste de fase (Carl Zeiss, Alemania). Se contabilizaron 100 conidias por aislado y se determinó el porcentaje de germinación para cada tiempo de agua libre analizado. Además, se determinó el porcentaje de conidias germinadas que formaron apresorios y se describió el tamaño y la morfología de los apresorios (Dodd *et al.*, 1991).

Posteriormente, las pruebas *in vivo* se llevaron a cabo en hojas de palto, pertenecientes al huerto de variedades de la facultad, las cuales fueron, recolectadas al azar de árboles asintomáticos, las que fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5% por 3 min. A partir de distintos sectores de cada hoja se cortaron discos de 5 mm de diámetro utilizando un perforador metálico estéril para luego establecer grupos al azar de 9 discos. Cada grupo de discos fue trasladado a cámaras húmedas que consistieron en placas Petri de vidrio con papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. Cada disco de hoja fue inoculado en el centro con los distintos aislados analizados (Cuadro 4), añadiendo una alícuota de 20 µL de una suspensión conidial ajustada a 10⁴ conidias·mL⁻¹. Cada cámara húmeda se incubó a 20°C por 2, 4, 8, 16 y 24 horas. Para visualizar las estructuras de los hongos en el tejido

vegetal, las muestras fueron decoloradas en etanol-cloroformo 3:1 vol/vol y luego teñidas con azul de lactofenol según la metodología descrita por O'Connell *et al.* (2004). Finalmente se contabilizaron 100 conidias para luego determinar el porcentaje de germinación en los distintos tiempos evaluados.

Ambos experimentos tuvieron un diseño completamente al azar, con estructura factorial de tratamientos (5×6), en donde el primer factor fue el tiempo de agua libre, con 5 niveles, mientras que el segundo factor fue la especie de *Colletotrichum* evaluada. Se realizaron dos replicas biológicas, las cuales fueron promediadas para obtener los tiempos necesarios para la germinación y formación de estructura de infección, además los porcentajes obtenidos para aquellas especies con dos aislados fueron promediados, corroborando que no existieran diferencias significativas entre ellos.

Determinación de patogenicidad de distintas especies de *Colletotrichum* sobre hojas.

Hojas de palto de la variedad Hass fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 minutos, lavadas con agua destilada estéril y secadas al interior de una cámara de flujo laminar. Las hojas fueron inoculadas con los aislados de las seis especies de *Colletotrichum* (Cuadro 2), depositando una alícuota de 20 µL de una suspensión conidial (10^4 conidias·mL⁻¹) sobre su superficie. Las hojas inoculadas fueron incubadas en cámaras húmedas por 2 semanas a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de la infección. Se realizaron doce repeticiones por especie considerando como control hojas no inoculadas. Finalmente, se midió el área de la lesión sobre las hojas, para lo cual se utilizó el programa ImageJ. El área de la lesión para cada especie se promedió previo al análisis.

Determinación de patogenicidad de distintas especies de *Colletotrichum* sobre frutos

Para estudiar la patogenicidad de las especies de *Colletotrichum* se colectaron frutos desde el huerto comercial, la colecta consistió en frutos de tamaño homogéneo, sanos e inmaduros de la variedad 'Hass'. Se utilizaron 4 frutos por especie, siendo cada fruto una repetición, teniéndose un total de 24 frutos. Para el inóculo se sembró un disco de micelio en placas de CYE, las cuales se cultivaron durante 7 días, momento en el cual se observó el desarrollo de acérvulos y masas de conidias. Posteriormente, se preparó una suspensión conidial para cada especie y se ajustó a 10^4 conidias·mL⁻¹. Los frutos fueron desinfectados e inoculados con una alícuota de 20 µL, mientras que en los testigos se depositó 20 µL de agua destilada estéril, para luego ser llevados a cámaras húmedas que se mantuvieron a una temperatura de 20°C por 2 semanas, momento en el cual se evidenció la sintomatología de antracnosis. Finalmente, se determinó la virulencia de las diferentes especies para lo cual se midió el diámetro de la lesión, para lo cual se cuantificaron dos diámetros perpendiculares usando un pie de metro, los diámetros se promediaron y se estableció para cada especie las medias, las cuales fueron comparadas entre sí

Cuadro 2. Aislados de *Colletotrichum* spp. estudiados en la patogenicidad de hojas y frutos

Especie	Aislados
<i>C. cigarro</i>	SDO1
<i>C. pyricola</i>	PEU2
<i>C. gloeosporioides</i>	FAM7
<i>C. sp.</i>	NAL53
<i>C. fructicola</i>	MER6
<i>C. beeveri</i>	NAL17

Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar de distintas especies de *Colletotrichum*

Los distintos aislados fueron cultivados por 7 días a 20 °C en agar papa dextrosa (PDA) para la obtención de micelio. Desde el borde en activo crecimiento de las colonias, se obtuvieron discos de 3 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocados de acero estéril, los cuales fueron sembrados al centro de placas Petri de 100 mm de diámetro con PDA, asegurando que la cara del disco con micelio estuviera en contacto con el medio de cultivo. Las placas fueron incubadas a 4, 10, 20, 28, 25, 30, 35 y 45 °C por 7 días y se realizaron mediciones diarias del diámetro del crecimiento del micelio con un pie de metro. Se calculó la tasa de crecimiento diaria para cada temperatura y posteriormente se promediaron. El experimento tuvo un diseño completamente al azar, considerando 3 repeticiones por aislado.

ANALISIS ESTADISTICO

Para las pruebas de agua libre *in vitro* e *in vivo* las variables medidas fueron sometidas a un análisis de varianza usando modelos lineales generalizados mixtos. Las medias fueron separadas utilizando el test LSD de Fisher con un 5% de significancia a través del software estadístico InfoStat versión 2011, integrando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2013).

Los resultados de las temperaturas de crecimiento se analizaron construyendo regresiones que permitieron definir la función que describió el comportamiento de la tasa de crecimiento miceliar de las 6 especies estudiadas. Posteriormente, se determinaron las temperaturas óptima, mínima y máxima de crecimiento. Las tasas de crecimiento entre los distintos hongos fueron sometidas a un análisis de varianza y las medias fueron separadas con el test LSD de Fisher.

RESULTADOS

Evaluación de adherencia de las conidias a una superficie hidrofóbica

El primer parámetro epidemiológico estudiado en las diferentes especies de *Colletotrichum*, fue la adherencia de conidias sobre una superficie hidrofóbica, debido a que homologa la superficie de un fruto. Los porcentajes se obtuvieron al inocular un grupo de 100 conidias y posteriormente lavarlas a los tiempos de 1, 5, 10, 15 y 30 minutos, desde una placa de poliestireno. Se consideró como una conidia adherida aquella conidia que se mantuvo adosada a la superficie hidrofóbica tras el lavado.

En el caso de las especies de *Colletotrichum* con dos aislados (*C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. gloeosporioides* y *C. sp.*), dado que no presentaron diferencias, los porcentajes individuales fueron promediados para analizar y determinar los tiempos de agua libre necesarios para la adhesión de conidias de cada especie. Los porcentajes de adherencia en los tiempos de 1, 5, 10, 15 y 30 minutos fueron graficados y ajustados a una función polinómica de segundo grado (Figura 1). Los datos indican un aumento en la adherencia de las 6 especies en función del tiempo, con valores bajo el 20% tras ser expuestas 1 minuto y valores sobre el 73% después de 30 minutos. Para cada especie se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de adherencia entre los distintos tiempos de incubación en la superficie hidrofóbica (Cuadro 3). Particularmente, las especies *C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. gloeosporioides* y *C. sp.* presentaron diferencias significativas en adherencia entre todos los tiempos evaluados. En cambio, en *C. fructicola* y *C. beeveri* la adherencia fue significativamente igual entre exposiciones de 10 y de 15 minutos, y entre 15 y 30 minutos, respectivamente.

Posteriormente, se compararon los porcentajes de adherencia entre especies en cada tiempo de incubación (Figura 2). Al primer minuto, las especies *C. pyricola* (19,1%), *C. cigarro* (14,6%) y *C. sp.* (14,3%) alcanzaron los mayores porcentajes de adherencia, seguidos por *C. gloeosporioides* (5,8%) y *C. fructicola* (5,7%), y finalmente, *C. beeveri*, con una adherencia de sólo 0,2%. A los 5 minutos *C. pyricola* (52,1%) presentó el porcentaje de adherencia más alto, el cual fue seguido por *C. sp.* (49,5%), *C. cigarro* (43,6%) y *C. gloeosporioides* (42,7%), en cambio los porcentajes más bajos correspondieron a *C. fructicola* (26,8%) y *C. beeveri* (24,7%), los cuales no presentaron diferencias en su adherencia. Para el tiempo de 10 minutos el porcentaje de adherencia más alto fue observado en *C. pyricola* (73,8%) seguido por *C. sp.* (63,6%), *C. gloeosporioides* (59,9%), *C. cigarro* (55,5%), *C. fructicola* (47,0%) y *C. beeveri*, que con un 41,56% fue coherentemente la especie con el menor porcentaje de adherencia. A los 15 minutos las especies *C. pyricola* (87,9%) y *C. sp.* (83,5%) alcanzaron los porcentajes de mayor adherencia, seguidos por *C. beeveri* (66,2%), *C. gloeosporioides* (65,7%), *C. cigarro* (59,3%) y *C. fructicola*, la cual correspondió al menor porcentaje de adherencia para este tiempo con un 55,9%. Finalmente, a los 30 minutos las especies *C. pyricola* (94,1%), *C. cigarro* (92,1%), *C. sp.* (90,1%) y *C. gloeosporioides* (87,8%), presentaron los mayores porcentajes de adherencia mientras que *C. beeveri* (73,3%) y *C. fructicola* (73,2%) fueron las especies con menor porcentaje de conidias adheridas a la superficie hidrofóbica.

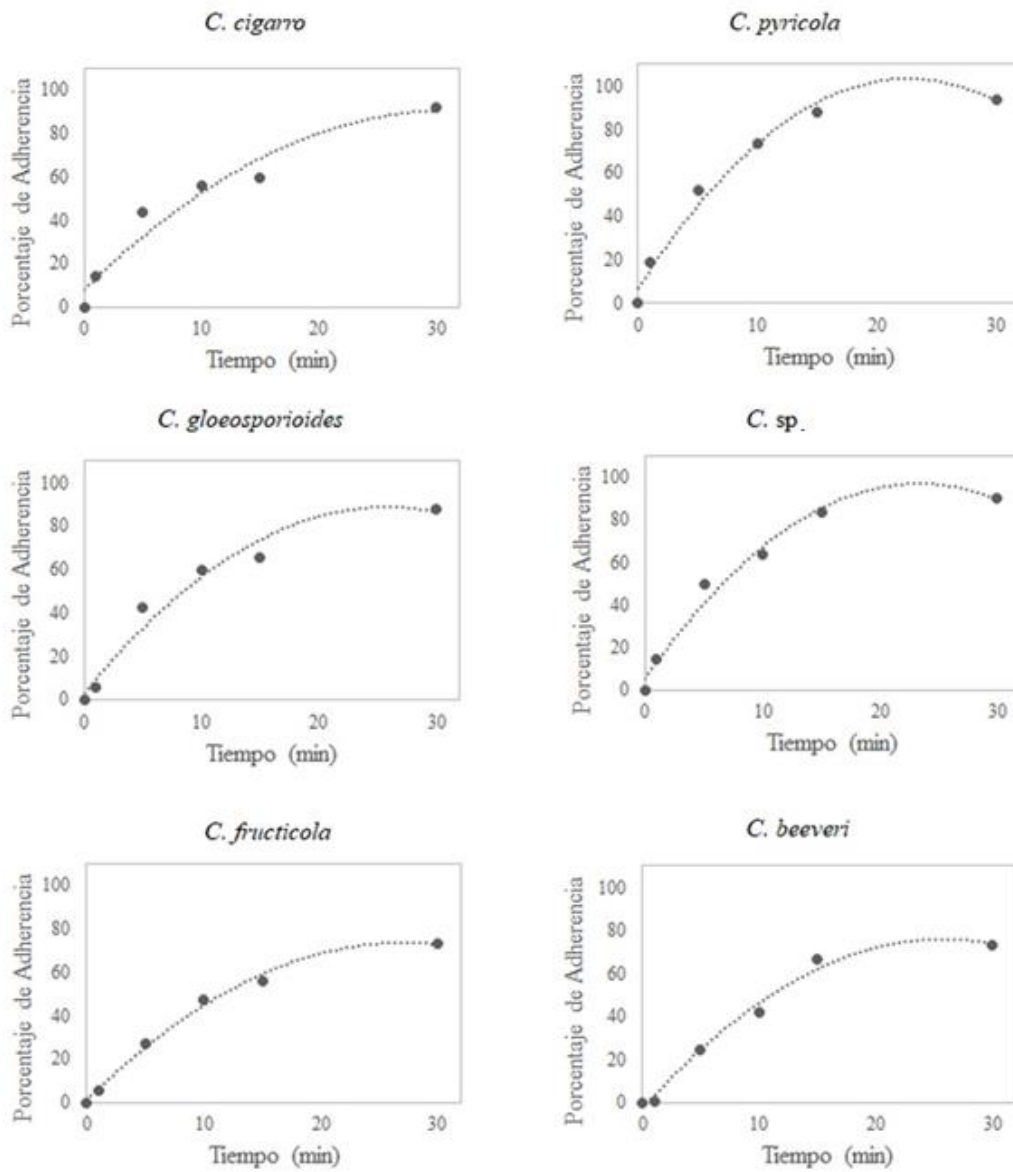


Figura 1. Porcentajes de adherencia de conidias de 6 especies de *Colletotrichum*, para los tiempos de 1, 5, 10, 15 y 30 minutos. La determinación de la adherencia se realizó en una superficie de poliestireno. Dos cepas fueron consideradas por especie (excepto para *C. beeveri* y *C. fructicola*). 100 conidias fueron utilizadas por ensayo. Cada punto mostrado corresponde a tres réplicas experimentales. Los datos fueron ajustados a un modelo de polinomio de segundo grado ($Y = at^2 + bt + c$). En donde Y = porcentaje de adherencia, t = tiempo y a, b y c, corresponden a los coeficientes de regresión

Cuadro 3. Porcentajes promedio de adherencia (%) de conidias a una superficie de poliestireno respecto del tiempo de exposición para las 6 especies de *Colletotrichum* estudiadas.

Tiempo (min)	<i>C. cigarro</i>	<i>C. pyricola</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. sp.</i>	<i>C. fructicola</i>	<i>C. beeveri</i>
1	14,8 e ¹	19,1 e	5,8 d	14,2 e	5,7 d	0,2 d
5	43,6 d	52,1 d	42,7 c	49,5 d	26,8 c	24,8 c
10	55,5 c	73,8 c	59,9 b	63,6 c	47,0 b	41,6 b
15	59,3 b	87,9 b	65,7 b	83,5 b	55,9 b	66,2 a
30	92,1 a	94,1 a	87,8 a	90,1 a	73,2 a	73,3 a

¹ Porcentajes con diferentes letras, en cada columna, presentan diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

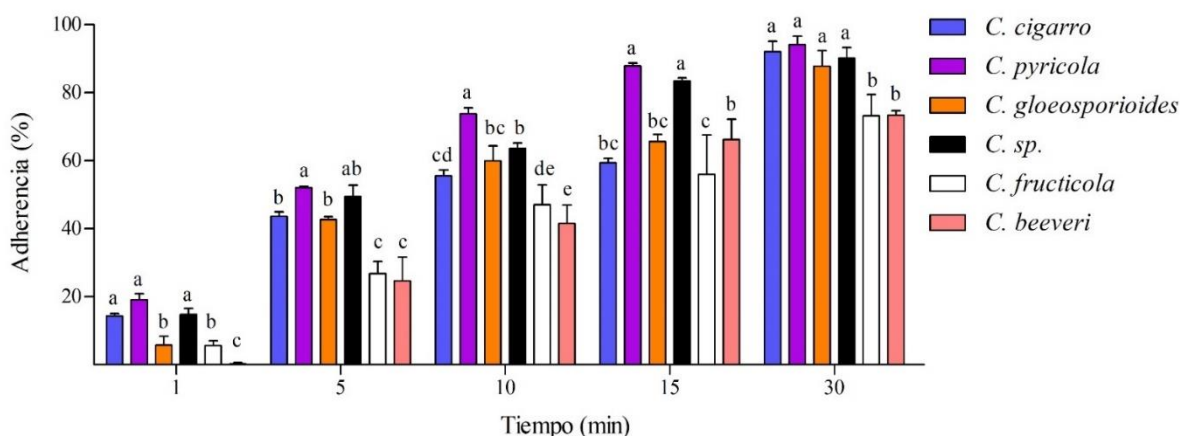


Figura 2. Evolución en el tiempo de los porcentajes de adherencia de conidias de 6 especies de *Colletotrichum*, a una superficie hidrofóbica de poliestireno. Cada barra representa el promedio de adherencia de dos aislados por especie (excepto para *C. beeveri* y *C. fructicola*). Barras con letras distintas para cada tiempo, indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Determinación del tiempo de agua libre necesario para la germinación de conidias y formación de estructuras de infección

Ensayos *in vitro* sobre una superficie hidrofóbica

El estudio consistió en la exposición de un grupo de 100 conidias a la presencia de una película de agua libre sobre una superficie hidrofóbica durante 2, 4, 8, 16 y 24 horas. Es importante destacar que los tubos germinativos presentaron longitudes variables, en donde, independiente del largo, se observó la diferenciación del apresorio en su extremo (Figura 3). Frente a lo cual se determinó que la evaluación de germinación contempló solo la observación de los tubos germinativos indistintamente de su largo.

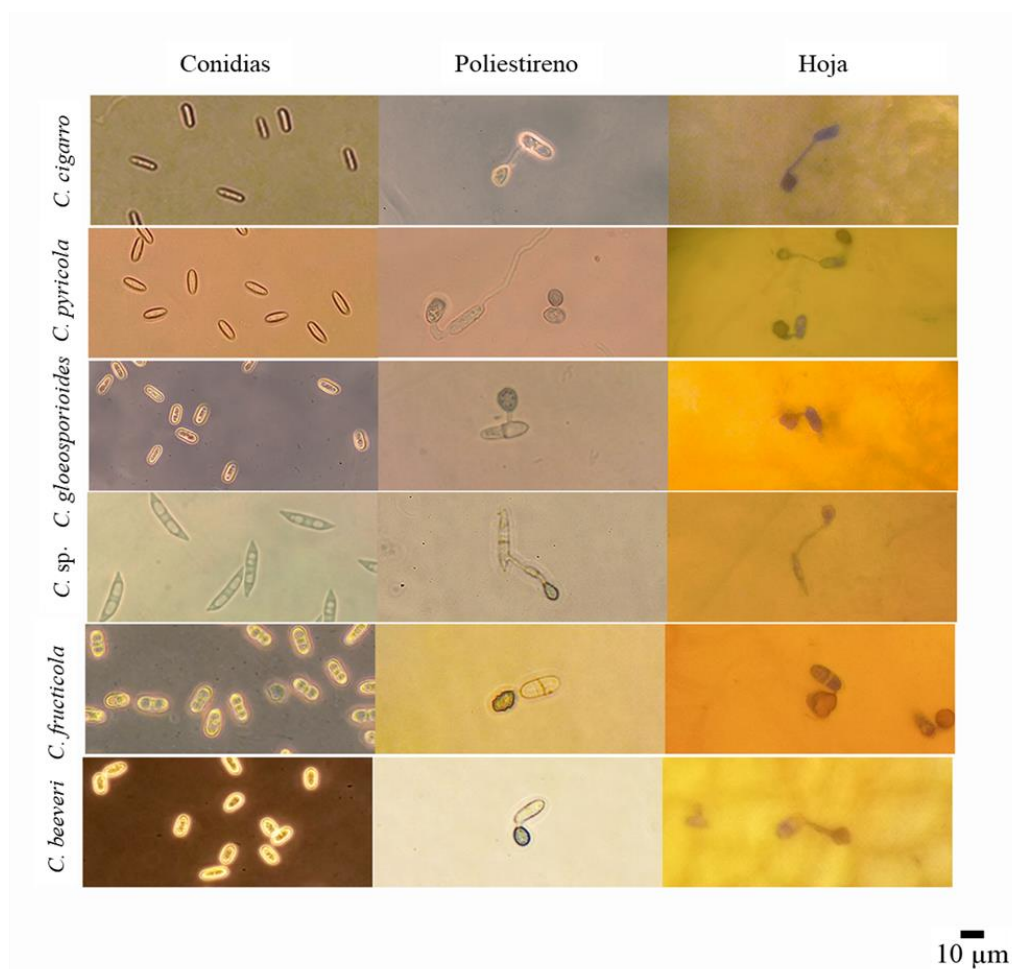


Figura 3. Estructuras de infección en las 6 especies de *Colletotrichum* estudiadas: La columna de la izquierda corresponde a las conidias de cada especie, la columna intermedia corresponde a conidias germinadas con la formación de apresorios en una superficie de poliestireno. La columna a la derecha corresponde a conidias germinadas con apresorios formados sobre hojas de palto.

Germinación de conidias sobre una superficie hidrofóbica

En términos generales se observó, para cada especie estudiada, que la germinación de conidias aumentó a mayor tiempo de agua libre (Figura 4). Los porcentajes de germinación comparados por tiempo revelan menores valores de germinación tras 2 horas de incubación (entre 0 y 1%), mientras que los valores más altos se registraron tras 24 horas (entre 70 y 91%). Luego, la germinación se comparó entre especies para cada tiempo de agua libre estudiado (Figura 5). En donde se observó que, tras 4 horas de exposición a la película de agua, la germinación aumentó en *C. pyricola* (35,2%), *C. fructicola* (31,0%), *C. gloeosporioides* (27,8%) y *C. cigarro* (27,5%), alcanzando los porcentajes más altos, siendo *C. sp.* (21,7%) y *C. beeveri* (11,7%) las especies con los porcentajes de germinación más bajos para este tiempo. Con 8 horas de agua libre el porcentaje de germinación más alto fue registrado en *C. pyricola* (44,7%), seguido por *C. cigarro* (40,7%), *C. gloeosporioides* (32,0%), *C. fructicola* (31,0%), *C. beeveri* (27,3%) y *C. sp.*, siendo esta última la especie de menor germinación con un 24,0%. Para el tiempo de 16 horas de agua libre, *C. pyricola* (68,0%), se mantuvo dentro de los valores más altos de germinación, aunque sin presentar diferencias con *C. gloeosporioides* (72,9%), estas fueron seguidas por *C. cigarro* (55,2%), *C. sp.* (51,8%) y *C. beeveri* (45,7%), siendo el porcentaje de germinación más bajo de 44,0% de la especie *C. fructicola*. Finalmente, con 24 horas de agua libre, los valores de germinación mayores fueron para *C. cigarro* (91,2%) y *C. gloeosporioides* (84,7%), seguidos de *C. pyricola* (80,8%), *C. fructicola* (80,3) y *C. beeveri* (81,2%), y finalmente, *C. sp.* con un 57,0%, que fue el menor valor de germinación.

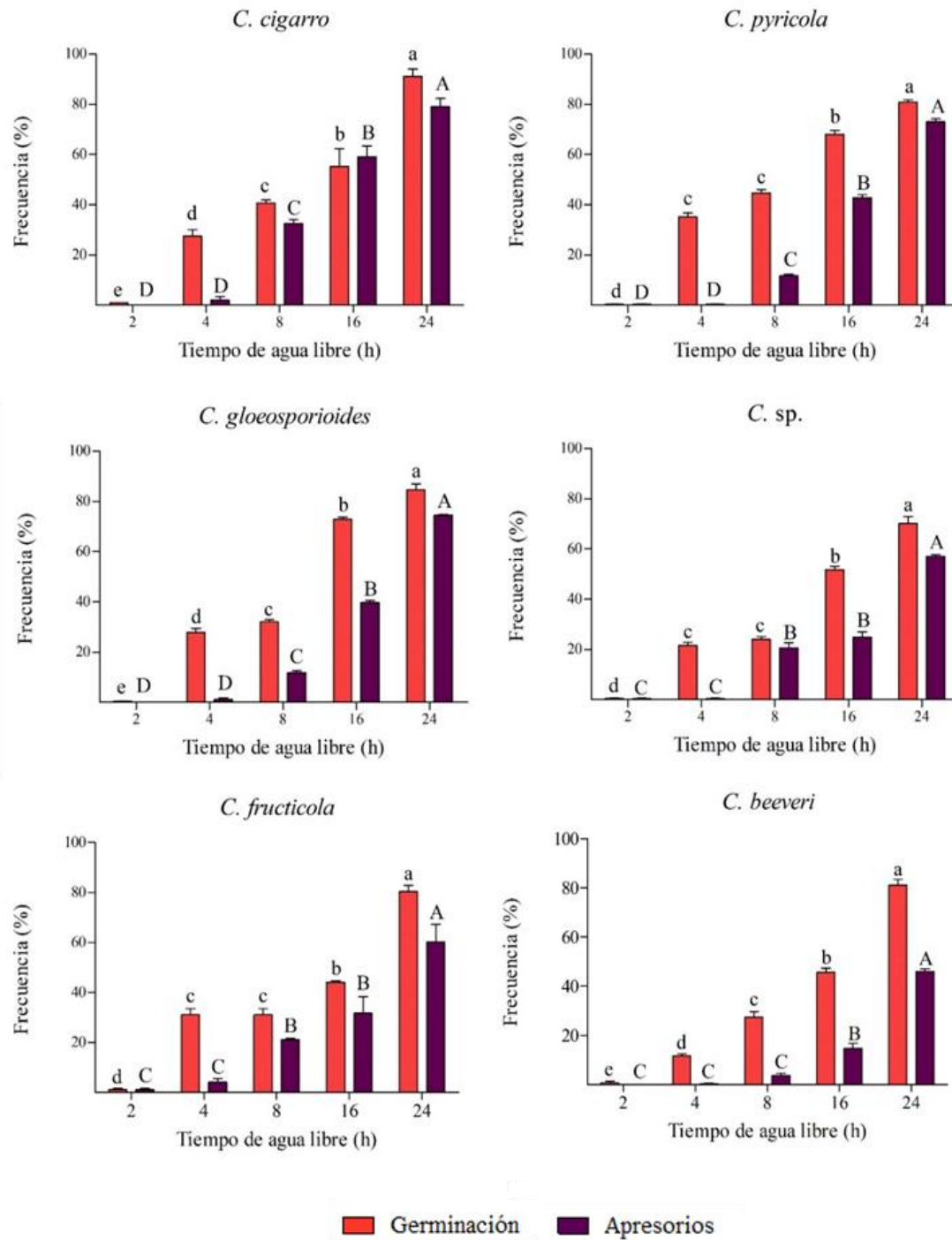


Figura 4. Evolución en el tiempo de los porcentajes de germinación de conidias y formación de apresorios de 6 especies de *Colletotrichum* en una superficie de poliestireno. Barras con letras minúsculas distintas indican diferencias significativas para el porcentaje de germinación por especie, mientras que barras con letras mayúsculas distintas indican diferencias en el porcentaje de formación de apresorios por especie, según la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

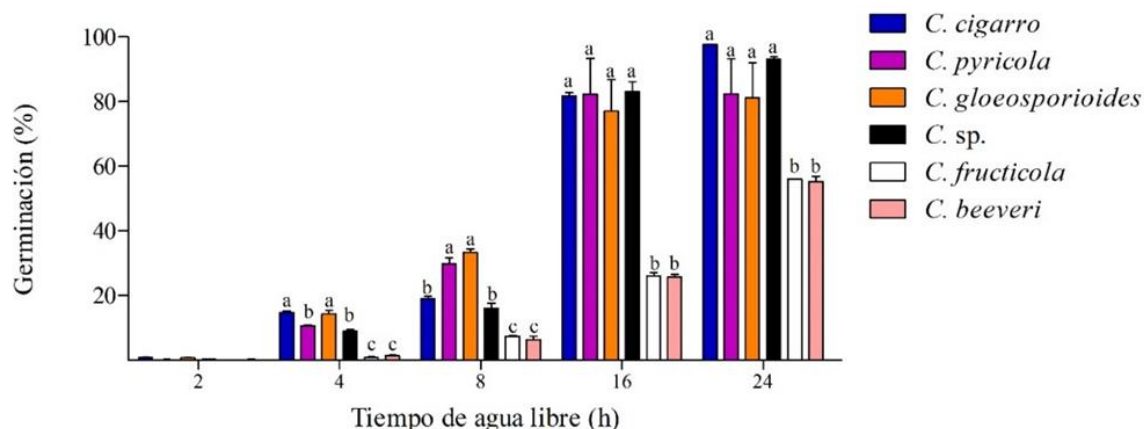


Figura 5. Evolución en el tiempo del porcentaje de germinación de 6 especies de *Colletotrichum*, sobre una superficie de poliestireno. Barras representan el promedio de los dos aislados por cada especie, cuando corresponde. Aquellas barras con letras distintas, para cada tiempo, presentan diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Formación de apresorios sobre una superficie hidrofóbica

Dado que la formación de apresorios es esencial para la penetración y la posterior infección, se contabilizó la presencia de estas estructuras en un grupo de 100 conidias expuestas a una película de agua en los tiempos de 2, 4, 8 y 16 horas, de las cuales se obtuvieron los porcentajes de formación de apresorios para cada especie. Para el recuento del porcentaje de formación de esta estructura de infección, se consideró como apresorio formado a aquellos diferenciados del tubo germinativo (ensanchamiento del tubo germinativo en forma de domo) y melanizados (acumulación de melanina en las paredes celulares que se evidencia en un oscurecimiento de la estructura) (Apéndices 6 y 7).

El ensayo permitió establecer que, en las 6 especies estudiadas, el porcentaje de formación de apresorios se incrementa a mayor tiempo de agua libre (Figura 6). En cada especie, los menores porcentajes de formación de apresorios se encontraron a 2 y 4 horas de agua libre, con valores entre 0 y 4%. Es relevante mencionar que en cinco de las seis especies estudiadas la presencia de apresorios comenzó a aumentar a partir de las 8 horas, *C. beeveri* fue la excepción donde los porcentajes de formación de apresorios se incrementaron significativamente a partir de las 16 horas de agua libre. Además, en todas las especies el mayor porcentaje de formación de apresorios se detectó a las 24 horas. Al comparar entre especies en cada tiempo de agua libre (Figura 6), la formación de apresorios fue igualmente baja tras 2 horas ($< 0,7\%$), a las 4 horas el mayor porcentaje lo presentó *C. fructicola* (4,0%), seguida por *C. cigarro* (2,0%), *C. gloeosporioides* (1,2%), *C. pyricola* (0,2%), *C. sp.* y *C. beeveri*, estos dos últimos con un 0,3%. A las 8 horas, los porcentajes aumentaron de forma

significativa, comparativamente *C. cigarro* (32,5%) alcanzó el valor más alto, seguida por *C. fructicola* (21,0%), *C. sp.* (20,7%), *C. gloeosporioides* (11,8%), *C. pyricola* (11,7%) y *C. beeveri* (3,7%). Para el tiempo de 16 horas, *C. cigarro* se mantuvo con el mayor porcentaje de apresorios observados con un 39,7%, mientras que para las especies *C. gloeosporioides* y *C. pyricola*, fueron de 59,0% y 42,8%, respectivamente, seguidos por *C. fructicola* (31,7%), *C. sp.* (24,8%) y *C. beeveri* con un 14,7%, consistentemente el más bajo del grupo. Finalmente, con 24 horas de agua libre, las especies *C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. gloeosporioides* alcanzaron igualmente la mayor formación de apresorios, con porcentajes promedio de 79,0%, 73,0% y 74,5%, respectivamente, mientras que *C. fructicola* y *C. gloeosporioides* presentaron porcentajes de 60,3% y 74,5%, siendo seguidos por *C. beeveri*, con un 46,0% (Apéndice 8).

Por otra parte, llamativamente, se observó la emergencia de dos tubos germinativos en las conidias de los aislados de la especie *C. pyricola* (Figura 7). La presencia de estas conidias fue contabilizada y se obtuvo un porcentaje promedio de 86,5% a las 24 horas de observación. Además, en un 66% de los casos se observó en el ápice de cada tubo germinativo el desarrollo de apresorios diferenciados morfológicamente y melanizados, lo que sugiere que ambos podrían ser funcionales al momento de iniciar el proceso de infección (Figura 9).

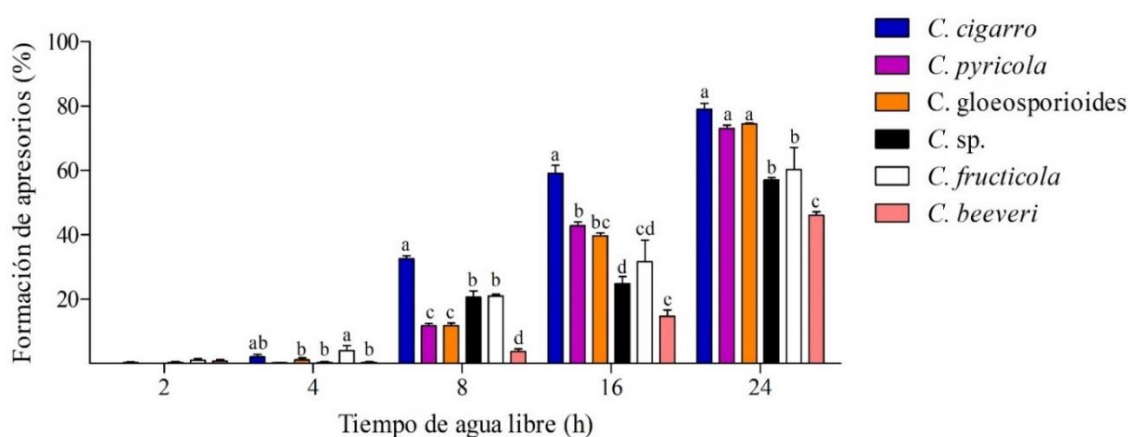


Figura 6. Evolución en el tiempo del porcentaje de apresorios formados, para 6 especies de *Colletotrichum*, sobre una superficie de poliestireno. Barras representan el promedio de los dos aislados por cada especie, cuando corresponde. Aquellas barras con letras distintas, para cada tiempo, presentan diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

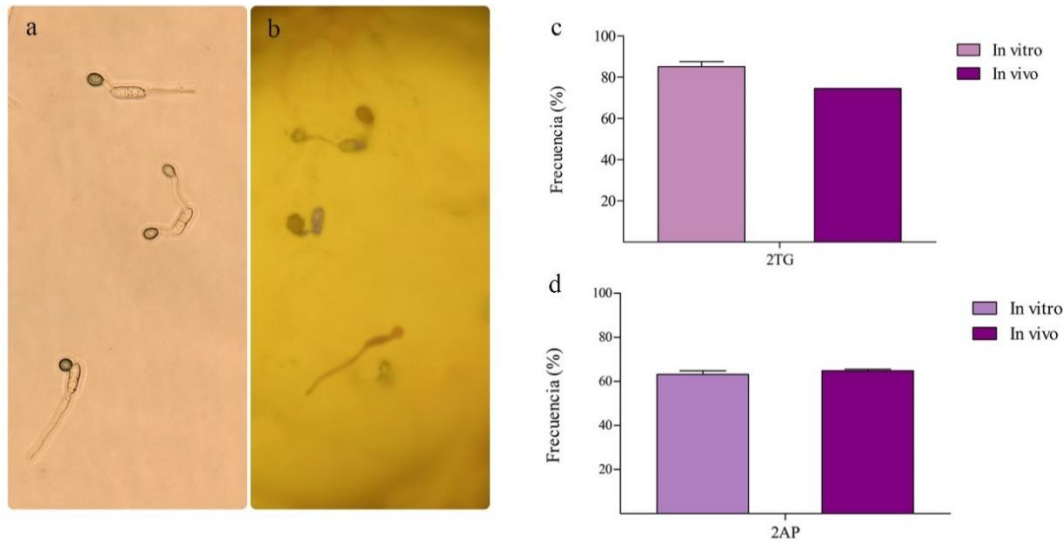


Figura 7. Presencia de conidias con dos tubos germinativos y doble formación de apresorios en la especie *C. pyricola*. a) Conidias sobre poliestireno. b) Conidias sobre hojas de palto. c) Frecuencia de conidias con formación de dos tubos germinativos (2TG) y d) Presencia de un apresorio en cada tubo germinativo (2AP).

Ensayos *in vivo* sobre hojas de palto

Germinación de conidias sobre hojas de palto

En cada especie se observó un aumento de la germinación de conidias a mayor tiempo de exposición a agua libre (Figura 8), encontrándose que, para el tiempo de 2 horas, los valores de germinación fueron mínimos, estando entre 0 y 0,7%. Es relevante mencionar que entre los tiempos de 2 y 4 horas la germinación se mantuvo igualmente baja para *C. beeveri* con valores de 0,1 y 1,4%, respectivamente. Mientras que los porcentajes de germinación más altos variaron entre 55,3 y 97,6%, los que correspondieron a *C. pyricola* y *C. gloeosporioides* entre las 16 y 24 horas, y para el resto de las especies en el tiempo de 24 horas. Al analizar los porcentajes de germinación entre especies (Figura 9), a las 2 horas, todas las especies presentaron valores de germinación igualmente bajos (< 1,0%), para el tiempo de 4 horas, los porcentajes más altos se observaron en *C. cigarro* y *C. gloeosporioides* con valores de 14,8 y 14,4%, respectivamente, seguidos por *C. pyricola* (10,6%) y *C. sp.* (8,9%), mientras que los porcentajes más bajos de germinación para este tiempo fueron los de *C. beeveri* y *C. fructicola* con un 1,4 y 0,8%, respectivamente. A las 8 horas, los valores de germinación más altos fueron para las conidias de *C. gloeosporioides* y *C. pyricola* con 33,4 y 29,7%, seguidos por *C. cigarro* (19,1%) y *C. sp.* (16,0%), mientras que los valores de germinación más bajos correspondieron nuevamente a *C. fructicola* y *C. beeveri* con 7,3 y 6,4%. Con 16 y 24 horas de agua libre, *C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. gloeosporioides*, y *C. sp.*, presentaron los porcentajes de germinación más altos, alcanzando valores por sobre el 80%, mientras que *C. fructicola* y *C. beeveri* presentaron valores significativamente menores para ambos tiempos con valores que fluctuaron para las 16 horas entre 26,1 y 25,8%, respectivamente, y para el tiempo de 24 horas entre un 56,0 y un 55,3%, respectivamente.

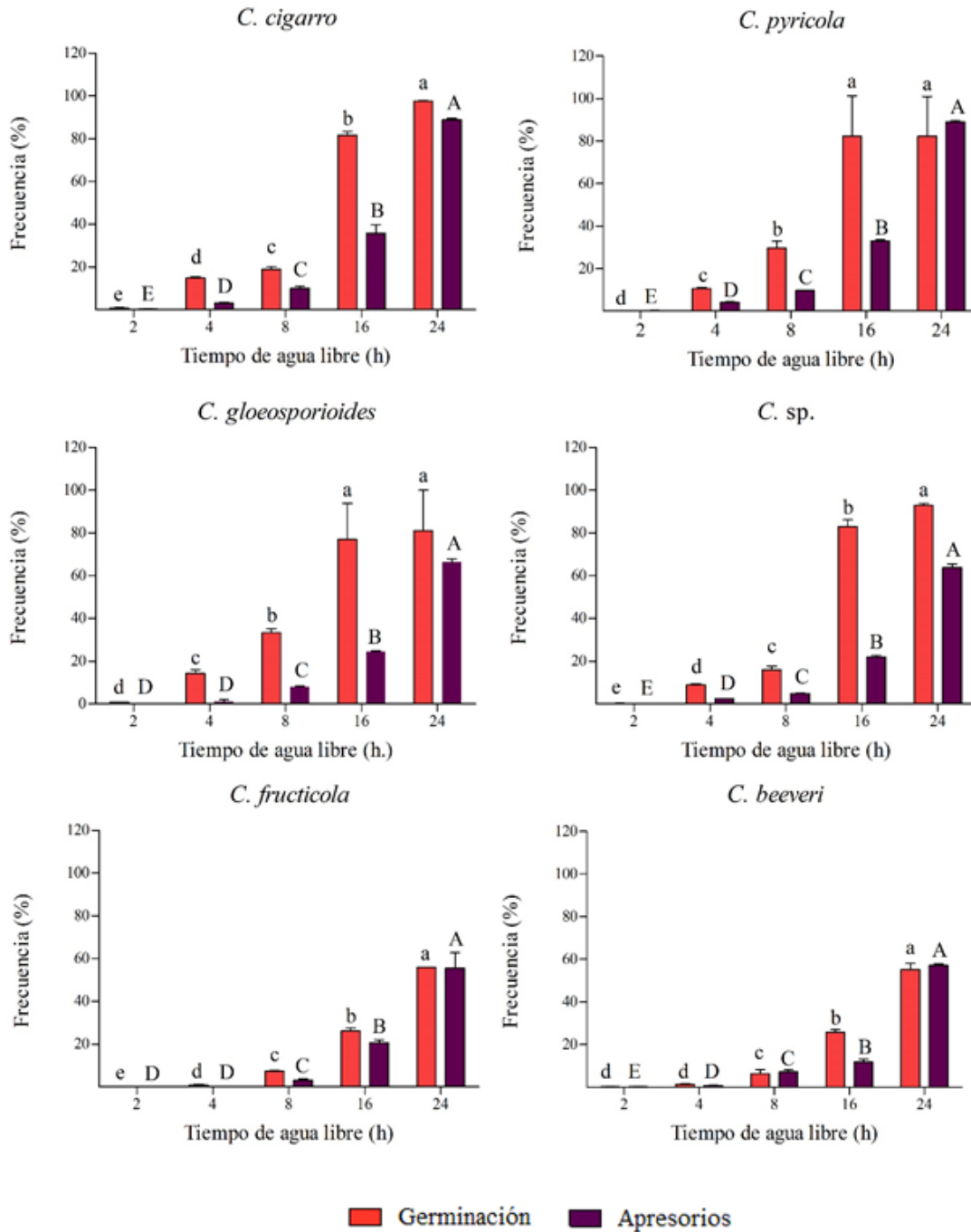


Figura 8. Evolución en el tiempo del porcentaje de germinación de conidias y formación de apresorios, para 6 diferentes especies de *Colletotrichum*, sobre hojas de palto. Barras con letras minúsculas distintas indican diferencias significativas para el porcentaje de germinación de conidias por especie, mientras que barras con letras mayúsculas distintas indican diferencias en el porcentaje de formación de apresorios por especie según la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

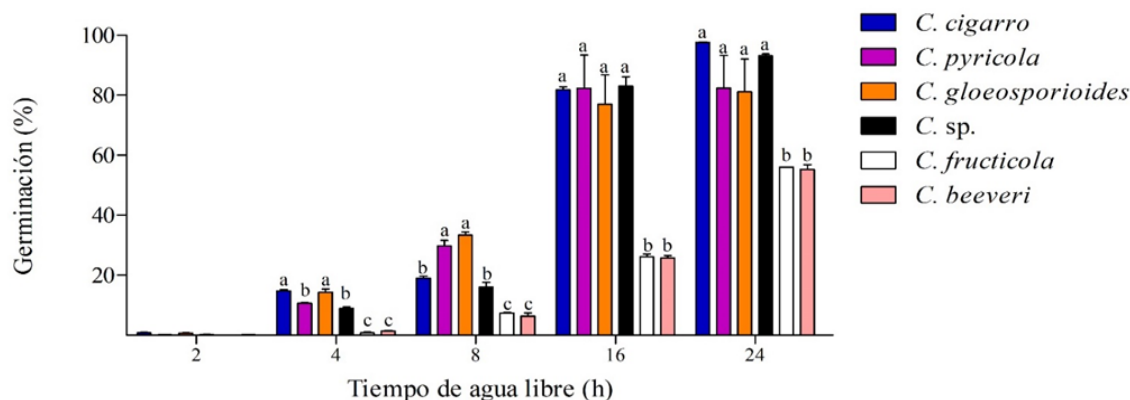


Figura 9. Evolución en el tiempo del porcentaje de germinación de conidias en el tiempo, para 6 especies de *Colletotrichum*, sobre hojas de palto. Barras representan el promedio de los dos aislados por cada especie, cuando corresponde. Aquellas barras con letras distintas, para cada tiempo, presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$)

Formación de apresorios en hojas de palto

En cuanto a la formación de apresorios, los porcentajes aumentaron a mayor tiempo de agua libre (Figura 8). Al comparar estadísticamente dentro de cada especie se observó que, con 2 y 4 horas de agua libre, la formación de apresorios fue mínima para todas las especies, en promedios que variaron entre 0,3 y 0,7%. Además, es importante mencionar que *C. gloeosporioides* y *C. fructicola* no presentaron diferencias entre los tiempos de 2 y 4 horas. A las 16 y 24 horas, se observó un aumento significativo de la formación de apresorios en todas las especies, los valores máximos fueron alcanzados a las 24 horas los cuales se encontraron por sobre el 57%. Posteriormente, al comparar entre especies (Figura 10) se observó que, para el tiempo de 2 horas, todos los porcentajes fueron igualmente bajos, mientras que, para las 4 horas, en donde comenzaron a encontrarse diferencias, el porcentaje mayor correspondió a la especie *C. pyricola* con un 4,2%, seguido por *C. cigarro* (3,2%), *C. sp.* (2,5%), *C. gloeosporioides* (1,2%) y *C. beeveri* (3,2%), mientras que en *C. fructicola*, no hubo desarrollo de apresorios. Para el tiempo de 8 horas los valores más altos fueron los de *C. cigarro* y *C. pyricola* con un 10,1 y 9,6%, seguidos por *C. gloeosporioides* (8,1%), *C. beeveri* (7,1%), *C. sp.* (4,9%) y *C. fructicola* (3,2%). Entre las 16 y 24 horas las especies *C. cigarro* y *C. pyricola* presentaron los mayores valores de formación de apresorios alcanzando un promedio de 88,9 y 89,1%, respectivamente, mientras que los menores porcentajes correspondieron a *C. fructicola* y *C. beeveri* que, para el tiempo final de 24 horas, tuvieron porcentajes del 57,1 y 55,7%, respectivamente (Apéndice 9).

En este caso, tal como en las evaluaciones de germinación sobre poliestireno, se observó en los aislados de la especie *C. pyricola* la emergencia de dos tubos germinativos, los cuales se desarrollaron en un 74,5% de las conidias germinadas a las 24 horas. Además, en un 64,8% de los casos se formó en ambos ápices un apresorio (Figura 7b).

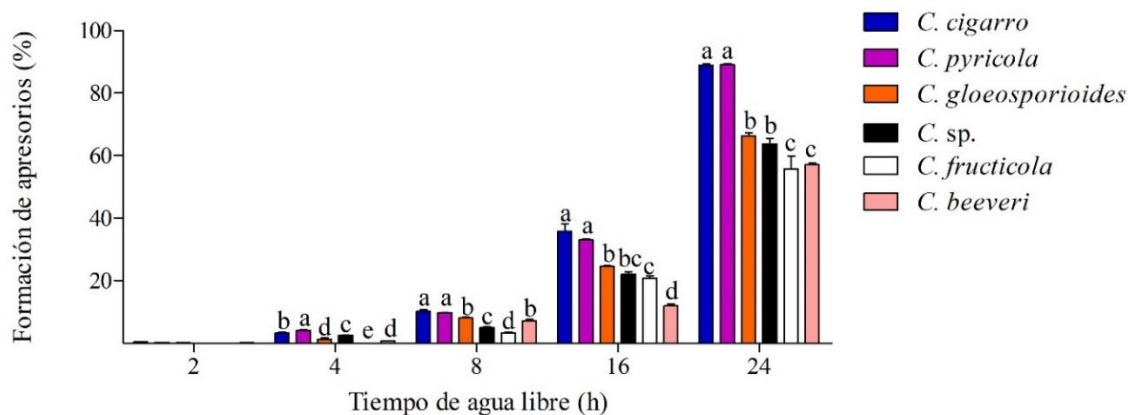


Figura 10. Evolución en el tiempo del porcentaje de formación de apresorios, para 6 especies de *Colletotrichum*, sobre hojas de palto. Barras representan el promedio de los dos aislados por cada especie, cuando corresponde. Aquellas barras con letras distintas, para el mismo tiempo, presentan diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$)

Pruebas de patogenicidad sobre hojas de palto

Dado que, los resultados obtenidos en las pruebas *in vivo* muestran que las especies *C. cigarro*, *C. gloeosporioides*, *C. pyricola* y *C. sp.*, presentan mayores porcentajes de germinación y formación de apresorios que las especies *C. fructicola* y *C. beeveri*, se procedió a evaluar la patogenicidad. Para comprender el proceso de infección entre las especies de *Colletotrichum* estudiadas y definir diferencias en su patogenicidad, se estudió la capacidad de infección en hojas de palto para un aislado por especie. Las hojas, una vez inoculadas, permanecieron por dos semanas en cámaras húmedas a temperatura ambiente.

A través de este estudio se observó que las especies *C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. gloeosporioides* y *C. sp.*, fueron capaces de infectar las hojas de palto, mientras que las hojas inoculadas con *C. fructicola* y *C. beeveri* no presentaron sintomatología (Figura 11). Las hojas infectadas fueron cuantificadas por especie y se construyó un gráfico de frecuencias (Figura 11b) en donde se observó que para *C. pyricola* un 50% de las hojas fueron infectadas, para *C. cigarro* y *C. sp.* el porcentaje de hojas infectadas correspondió, en ambas especies, a un 66,7% y finalmente para *C. gloeosporioides* correspondió a un 75%. Por otro lado, *C. cigarro* generó las lesiones de mayor tamaño en las hojas seguido de *C. gloeosporioides*, mientras que *C. pyricola* y *C. sp.*, produjeron las lesiones de menor tamaño (Figura 11c). Interesantemente, en las hojas inoculadas con *C. pyricola* se observó, en todas las hojas que no presentaron síntomas, micelio en los puntos en donde se depositó la alícuota de inoculación. Al observar en detalle, se identificaron apresorios producidos por el micelio sobre el tejido (Figura 12).

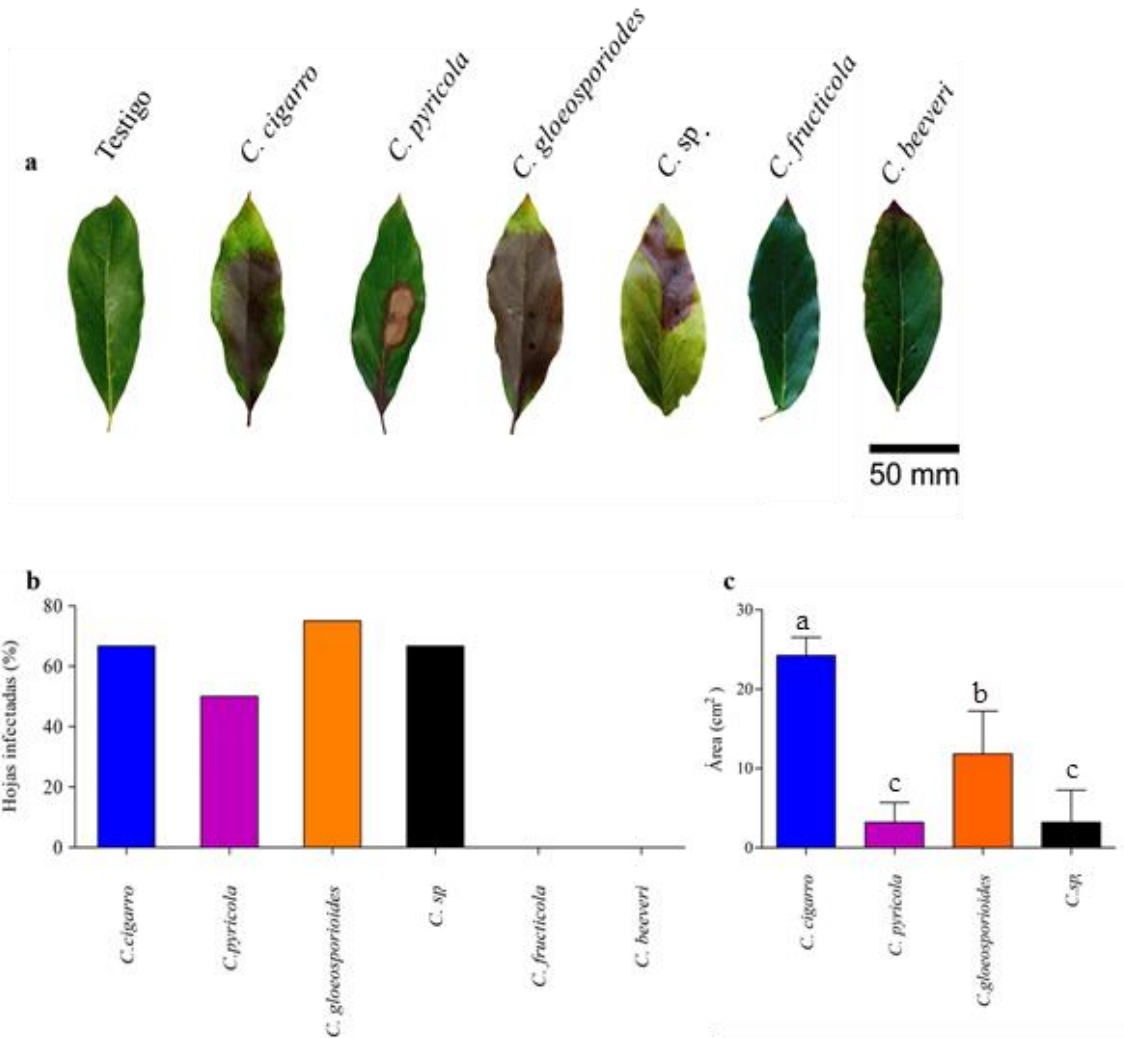


Figura 11. Patogenicidad en hojas de palto de las 6 especies de *Colletotrichum* estudiadas. a) Hojas infectadas con las diferentes especies estudiadas a las 2 semanas post-inoculación. b) Porcentaje de hojas infectadas y c) Área promedio de la lesión por cada especie.

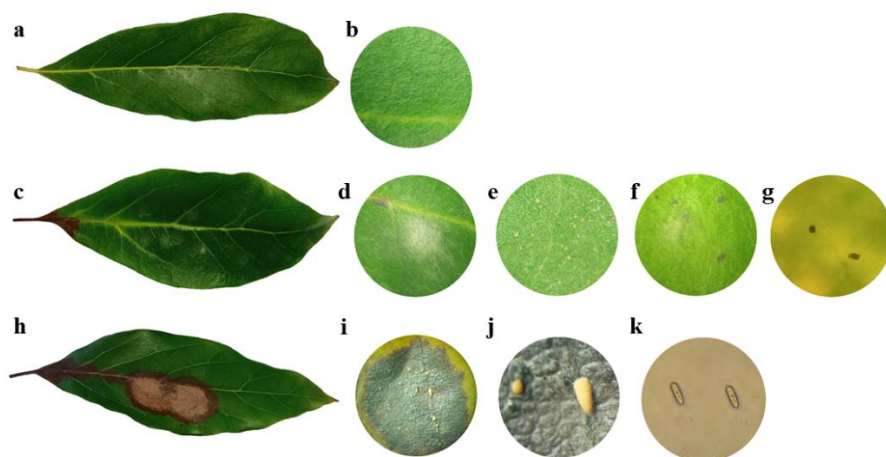


Figura 12. Diferentes etapas de infección en hojas inoculadas con *C. pyricola*. a) y b) corresponde al testigo, siendo b un acercamiento a la superficie de la hoja. c - g) hojas en que se observó desarrollo superficial del crecimiento del hongo, en donde d) corresponde un acercamiento al micelio, e) a la presencia de masas de conidias anaranjadas, f) a la presencia de sectores necróticos y g) a la observación microscópica de apresorios en el micelio. h) corresponde a una hoja infectada con *C. pyricola* en donde se observó sintomatología y la presencia de lesiones en donde i) es un acercamiento a la lesión, j) la presencia de acérvulos en la lesión y k) a la observación microscópica de conidias.

Pruebas de patogenicidad sobre frutos de palto

Se realizaron pruebas de patogenicidad sobre frutos de palto de la variedad Hass para establecer diferencias en la capacidad de infección y la virulencia entre las seis especies de *Colletotrichum* estudiadas. Los resultados mostraron que todos los frutos presentaron sintomatología típica de la antracnosis en el punto de inoculación con *Colletotrichum* de las diferentes especies, mientras que en los frutos testigos no se observó el desarrollo de antracnosis. En cuanto a la virulencia de las especies, se observó que *C. pyricola* correspondió a la más virulenta con un diámetro de la lesión promedio de 29,9 mm, encontrándose las especies *C. gloeosporioides* (21,1 mm), *C. cigarro* (20,6 mm), *C. fructicola* (19,9 mm), *C. sp.* (19,6 mm), con valores intermedios, mientras *C. beeveri* fue la especie que presentó una menor virulencia, con un diámetro de lesión promedio de 15,2 mm (Figura 13).

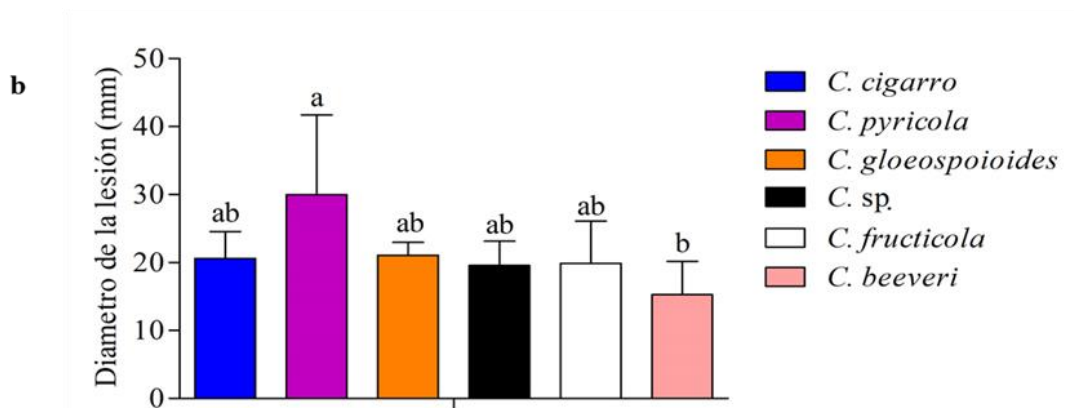


Figura 13. Patogenicidad en frutos de palto variedad Hass de las 6 especies de *Colletotrichum* estudiadas. a) Lesiones de antracnosis en las paltas, 2 semanas después de la inoculación. b) Diámetro de la lesión promedio para cada una de las especies.

Efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar

Para aproximar el impacto de la temperatura ambiental en el desarrollo de las especies de *Colletotrichum* bajo análisis, se estudió el efecto de la temperatura en el crecimiento miceliar. Para esto, un disco de micelio de 5 mm fue depositado en placas Petri con medio de cultivo PDA y se evaluó su crecimiento radial bajo las temperaturas de 4, 10, 20, 25, 28, 30, 35 y 45°C. En el caso de las especies con más de un aislado el resultado de las mediciones se promedió. Con ello se calculó la tasa de crecimiento diario para cada temperatura y se construyó un gráfico de dispersión para cada especie, el cual se ajustó a una curva polinómica de segundo grado que permitió estimar el valor de la temperatura óptima, mínima y máxima.

Los resultados mostraron que para todas las especies la tasa mínima de crecimiento observada fue a los 4°C, con valores entre los 0,4 y 1,1 mm·día⁻¹, posteriormente, con el aumento de temperatura las tasas aumentaron llegando a valores máximos que se observaron a los 20°, 28° y 30°C. Las especies que presentaron valores de tasa más altos de crecimiento a los 20°C fueron *C. pyricola*, *C. sp.* y *C. beeveri*, y variaron entre 6,5 y 8 mm·día⁻¹. Mientras que para *C. cigarro* y *C. gloeosporioides* sus tasas más altas fueron observadas a los 28°C, con valores de 12,7 y 10,3 mm·día⁻¹, respectivamente. Finalmente, para la especie *C. fructicola* la tasa de crecimiento más alta observada fue de 13,8 mm·día⁻¹, alcanzada a la temperatura de 30°C (Cuadro 4). Sólo *C. fructicola* creció a 35°C mientras que ninguna de las especies creció a 45°C.

Cuadro 4. Tasa de crecimiento diario (mm·día⁻¹) de 6 especies de *Colletotrichum*, incubadas a diferentes temperaturas durante 7 días. La tasa se determinó a través de mediciones diarias del diámetro de crecimiento del micelio incubado en medio de cultivo PDA.

Especie	Tasa de crecimiento (mm·día ⁻¹)							
	4°C	10°C	20°C	25°C	28°C	30°C	35°C	45°C
<i>C. cigarro</i>	0,4	1,7	11,1	11,3	12,7	7,2	0	0
<i>C. pyricola</i>	1,1	4,5	7,7	6,3	2,5	1,2	0	0
<i>C. gloeosporioides</i>	0,7	3,4	6,8	6,6	10,3	5,9	0	0
<i>C. sp.</i>	0,8	4,2	8,0	7,0	5,6	0,9	0	0
<i>C. fructicola</i>	0,5	5,9	7,8	10,8	12,2	13,8	1,6	0
<i>C. beeveri</i>	0,5	1,5	6,5	4,5	2,0	1,5	0	0

Una vez determinadas las tasas de crecimiento para cada especie, a las diferentes temperaturas evaluadas, se procedió a construir un gráfico de dispersión (Figura 14), donde las tasas fueron ajustadas a una línea de tendencia polinómica de segundo grado. Esto permitió estimar, a través de la ecuación cuadrática correspondiente, la temperatura óptima, mínima y máxima de cada especie (Cuadro 5). Se estimó que la temperatura mínima de desarrollo más baja correspondió a *C. pyricola* con una temperatura de 2,5°C, seguido por *C. sp.* y *C. fructicola* con 3,5 y 3,6 °C, respectivamente. Mientras que, para las especies *C. beeveri*, *C. gloeosporioides* y *C. cigarro* las temperaturas mínimas de desarrollo fueron de 4,1; 4,3 y 5,3°C, siendo esta última, la especie con la temperatura mínima más alta. En cuanto a las temperaturas óptimas de desarrollo, estas fluctuaron para todas las especies entre los 18 a los 23,8 °C, correspondiendo este último valor a *C. fructicola*. Respecto a las temperaturas máximas de desarrollo, los resultados mostraron que la especie *C. fructicola* presentó una temperatura máxima de desarrollo de 44°C, seguida por *C. cigarro* y *C. gloeosporioides* con 35°C. Por otra parte, la temperatura máxima más baja correspondió a *C. pyricola* con 33,6°C, seguida por *C. sp.* y *C. beeveri* con 34,1 y 34,2 °C, respectivamente.

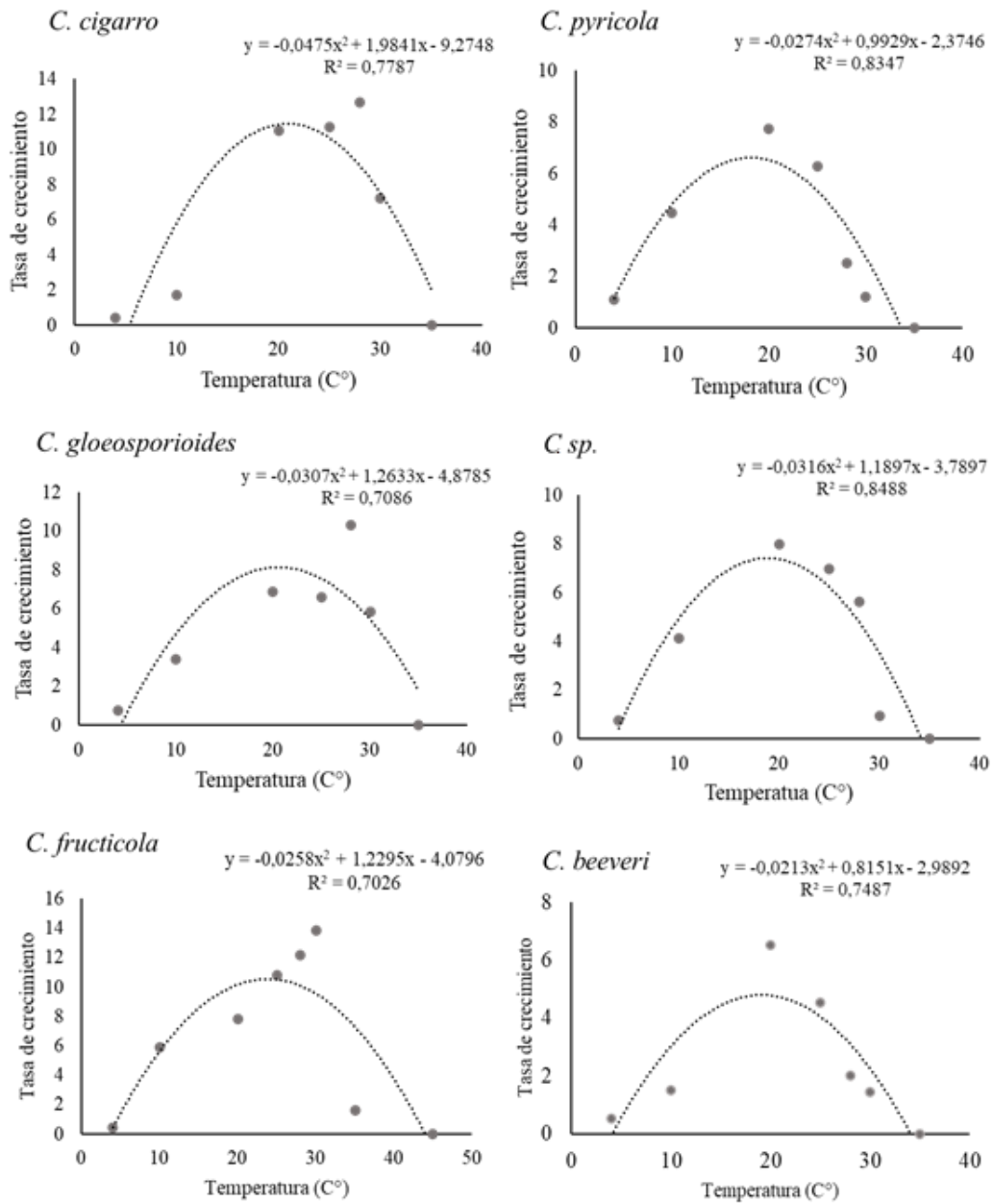


Figura 14. Tasas de crecimiento (mm/día) respecto de la temperatura de incubación para cada especie de *Colletotrichum* estudiada. Para todas las especies se ajustó a una línea de tendencia cuadrática que describe de mejor manera el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los hongos estudiados. ($Y = aT^2 + bT + c$). En donde Y=crecimiento micelial (mm/día), T= temperatura y a, b y c, corresponden a los coeficientes de regresión

Cuadro 5. Temperatura mínima, óptima y máxima de crecimiento miceliar para las 6 especies de *Colletotrichum* estudiadas.

Especie	Temperatura (°C)		
	Mínima	Optima	Máxima
<i>C. cigarro</i>	5,3	20,8	35
<i>C. pyricola</i>	2,5	18,1	33,6
<i>C. gloeosporioides</i>	4,3	20,6	35
<i>C. sp.</i>	3,5	18,8	34,1
<i>C. fructicola</i>	3,6	23,8	44
<i>C. beeveri</i>	4,1	19,1	34,2

DISCUSIÓN

Evaluación de la adherencia de las conidias a una superficie hidrofóbica

Los recientes estudios de la antracnosis de la palta en Chile, han revelado la presencia de 10 diferentes especies de *Colletotrichum* responsables de la enfermedad, además de la variabilidad en la diversidad y abundancia de estas especies en los huertos del país (Bustamante, 2019). Considerando diversos reportes que establecen que especies de *Colletotrichum* infectando a un mismo hospedero presentan adaptaciones en el proceso de infección que dan cuenta de la epidemiología de la enfermedad y su ecología. En esta tesis se evaluaron parámetros epidemiológicos para 6 especies de *Colletotrichum* que afectan a la palta en Chile, buscando establecer diferencias entre ellas que expliquen la diversidad en su abundancia, para lo cual las especies fueron seleccionadas por presentar mayor o menor prevalencia en el campo. Se escogió *C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. gloeosporioides*, como especies de mayor abundancia, mientras que entre las de menor frecuencia en el campo se seleccionaron *C. fructicola*, *C. sp.* y *C. beeveri*. Los estudios se centraron en procesos claves en la infección, en donde se evaluó la adherencia, germinación y formación de apresorios en las conidias, así como, la capacidad de las diferentes especies de infectar hojas y frutos.

El primer parámetro evaluado fue la adhesión de las conidias, proceso que concede a la espora estabilidad y tiempo de recibir los estímulos que se requieren para iniciar la germinación y la posterior formación de apresorios, por lo que es un componente esencial en el proceso de infección y en el desarrollo de la enfermedad (Mercure *et al.*, 1994b; Rawlings *et al.*, 2007). Frente a esto, es importante considerar que la adherencia está estrechamente relacionada con las características de la superficie del tejido del hospedero. Estudios en *C. lindemuthianum* mostraron una disminución significativa de la adhesión de las conidias cuando se retiró la cera en hipocotilos de poroto (Young y Kauss, 1983). En coherencia con esto, se ha mostrado

que al separar la conidia de *C. graminicola* del punto de adhesión en hojas de maíz se desprende una porción de cutícula de esta, demostrando la estrecha interacción entre la conidia y la superficie del hospedero (Mercure *et al.*, 1994b). Por lo que en este estudio se utilizaron placas Petri de poliestireno transparente debido a sus características hidrofóbicas, las cuales se mencionan necesarias para la unión firme de las esporas de *Colletotrichum* a la superficie (Sela-Buurlage, *et al.*, 1991). Esto ha sido afirmado en diferentes estudios con *C. lindemuthianum*, *C. graminicola*, *C. musae* y *C. gloeosporioides*, en donde se ha podido observar que no existen diferencias en la adherencia estudiada entre placas de poliestireno, frutos, hojas y superficies modificadas con cera (Young y Kauss, 1983; Sela-Buurlage *et al.*, 1991; Podila *et al.*, 1993; Chaky *et al.*, 2001). Esto estaría dado principalmente porque las características hidrofóbicas de estas superficies y el poliestireno son similares. La hidrofobicidad en una superficie se ha establecido a través del parámetro del ángulo de contacto, el que consiste en el cálculo del ángulo que forma la gota de agua sobre la zona en que se deposita, este parámetro permite establecer la humectabilidad de las superficies estudiadas y ha definido que la adhesión de conidias comienza a ser efectiva en superficies que presentan valores por sobre los 50°, siendo en poliestireno de 120° (Zelinger *et al.*, 2006) y en frutos de palto, que se caracterizan por ser ricos en ceras, en valores que varían de 92° a 102° dependiendo de la madurez del fruto (Gaskin y Pathan, 2006). Por lo que estos antecedentes y los resultados obtenidos en esta tesis, en donde se observaron para todas las especies, valores en la adherencia de conidias por sobre el 70%, sugieren que el estudio de la adherencia de las especies de *Colletotrichum* que afectan al palto, sobre superficies de poliestireno, consiste en un buen modelo para entender y evaluar este proceso.

Por otra parte, en esta tesis, se evidenció un aumento de la adherencia en el tiempo, alcanzando valores por sobre el 50% en todas las especies a partir de los 15 minutos, mientras que el porcentaje más alto de adhesión fue para todos los casos estudiados a los 30 minutos. Estos resultados contrastan a los obtenidos en estudios enfocados en la adhesión de especies de *Colletotrichum* sobre poliestireno. En donde, los porcentajes de adhesión para *C. lindemuthianum* fueron de 100% a los 15 minutos de incubación (Stanley *et al.* 2002), en *C. musae* de 94% a las 2 horas y para *C. graminicola* de un 30% a los 30 minutos, patógenos causantes de la antracnosis en poroto (*Phaseolus vulgaris*), banana (*Musa paradisiaca*) y maíz (*Zea may*), correspondientemente (Sela-Buurlage *et al.*, 1991). Lo que deja en evidencia que la adherencia de *Colletotrichum* es variable entre las especies y sus hospederos. Estas diferencias podrían explicarse, considerando que, pese a que la hidrofobicidad es un factor clave en la adhesión, la composición de las ceras y la topografía (tricomas, surcos, relieves, etc.) del tejido del hospedero a infectar también serían relevantes para la fijación inicial de la conidia (Zelinger *et al.*, 2006).

Sumado a los trabajos que han explorado la adherencia en las especies de *Colletotrichum* en diferentes hospederos, en este estudio se observó que, al comparar los porcentajes de adherencia de las 6 especies entre sí, durante todos los tiempos evaluados (1, 5, 10, 15 y 30 minutos) se encontraron diferencias, las cuales, se presentaron desde el primer minuto (Figura 1). En el transcurso del tiempo se observó como la adherencia de *C. pyricola* y *C. sp.* se mantuvieron entre los porcentajes más altos, mientras que *C. fructicola* y *C. beeveri* se encontraron entre las especies con un menor porcentaje de conidias adheridas. Las especies *C. cigarro* y *C. gloeosporioides*, presentaron adherencias promedio intermedias, sin embargo, al tiempo final de 30 minutos, estas especies se agruparon entre los porcentajes

más altos. Frente a esto, la literatura menciona que esta primera interacción con la superficie es un proceso pasivo y bastante rápido, pudiendo evidenciarse desde los 30 segundos (Zelinger *et al.*, 2006). Lo cual, sin embargo, sólo se ve reflejado en *C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. sp.*, en donde los porcentajes de adherencia variaron entre un 14-19% luego de un minuto. Por el contrario, *C. gloeosporioides*, *C. fructicola* y *C. beeveri* presentaron un proceso de adherencia inicial más lento. Por lo que, desde esta perspectiva, aquellas especies que son capaces de adherirse rápidamente se verían favorecidas frente a condiciones de lluvias en comparación a aquellas especies que tienen un proceso de adhesión más lento.

Por otra parte, en cuanto a que podría determinar las diferencias de adherencia entre las especies estudiadas, si bien no existen estudios que den antecedentes, se sabe que las conidias se encuentran embebidas en una matriz que estaría relacionada con la efectividad de la adhesión (Perfect *et al.*, 1999; Armestos *et al.*, 2020). Esta idea es respaldada a través de estudios ultraestructurales en *C. truncatum*, *C. antramentarium*, *C. orbiculare* y *C. graminicola* (Griffiths y Cambell, 1973; Van-Dyke y Mims, 1991; Pain *et al.*, 1992), en donde se observó la presencia de una matriz proteica fibrilar alrededor de las conidias, la cual al ser removida resulta en una disminución en la adhesión (Sela-Buurlage *et al.*, 1991; Mercure *et al.*, 1994a; Rawlings *et al.*, 2007). Concordantemente, estudios en la composición de esta capa han determinado una alta presencia de glicoproteínas, las cuales al ser inactivadas o removidas tienen como consecuencia la alteración y disminución en la adherencia de esporas (Rawlings *et al.*, 2007). Estudios con anticuerpos monoclonales (MAb) han permitido caracterizar las glicoproteínas presentes en esta matriz, en donde se menciona que en *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. orbiculare* y *C. trifolii*, la matriz se une con mayor intensidad a MAb UB20, el cual reconoce epítomos de hidratos de carbono en las cadenas laterales N-linked de glicoproteínas (Pain *et al.*, 1992; O'connell *et al.*, 1996; Perfect *et al.*, 1999). Estos estudios sugieren que glicoproteínas de 110 kDa, con grupos de hidroxilos vecinales y residuos de N-acetilgalactosamina, conformarían esta capa fibrilar y formarían parte de esta rápida adherencia inicial (O'connell *et al.*, 1996; Perfect *et al.*, 1999). Interesantemente, al analizar la presencia de glicoproteínas reconocidas por UB20 en *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. capsii*, *C. coffeanum*, *C. destructivum*, *C. graminicola*, *C. lindemuthianum*, *C. musae*, *C. orbiculare* y *C. trifolii*, el anticuerpo solo se ligó a *C. lindemuthianum*, *C. orbiculare* y *C. trifolii* (Paien *et al.*, 1992), lo que da cuenta de la diferencia de composición de glicoproteínas. Por lo que se sugiere que las diferencias en la composición de glicoproteínas, su abundancia o ausencia, podría ser la causa de las diferencias de adhesión entre las especies estudiadas.

Adicionalmente, en este estudio se observó una estabilización de la adherencia de las conidias a los 30 minutos, en donde las especies se dividieron en dos grupos, el primero cuyos porcentajes de adherencia alcanzaron altos valores, entre 87% y 94%, como son *C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. gloeosporioides* y *C. sp.*, y aquellas especies con una menor adhesión cuyos porcentajes de germinación fueron cercanos al 73%. Respecto a esto, se señala que las conidias presentan un segundo proceso de adherencia, determinado por la síntesis de proteínas secretadas desde el ápice de la conidia y que permiten el asentamiento de las estructuras que posteriormente serán formadas (tuvo germinativo y apresorio) (Perfect *et al.*, 1999; Rawlings *et al.*, 2007). La secreción de este segundo grupo de proteínas puede desempeñar un papel clave para comprender la variabilidad inicial y la posterior consolidación de la adhesión al tiempo final, además de las diferencias observadas entre las

especies de *Colletotrichum* bajo estudio. En cuanto a la composición de la matriz extracelular, que resulta de la secreción de compuestos desde la conidia corresponde, también, a un conjunto de glicoproteínas, aunque diferentes a las presentes en la conidia que aún no han germinado. Pain *et al.*, (1996), mencionan que para las conidias de *C. lindemuthianum*, las glicoproteínas presentes en esta segunda etapa de adhesión serían dos, de 133 kDa y de 146 kDa, mientras que posteriormente Hutchison *et al.* (2000), reconocieron una tercera glicoproteína superior a 200 kDa. Asimismo, estudios recientes (Zhang *et al.*, 2018) sobre el proceso de infección de *C. fructicola* en frutillas, reportaron la sobre expresión de genes que codifican para pequeñas proteínas hidrofóbicas implicadas en la adhesión. Por lo que queda en evidencia que existe una composición diferencial entre las matrices que recubren a las conidias en la primera etapa de adherencia, proveniente desde el acérvulo, tanto como en la posterior síntesis de moléculas que participaran en la adhesión del tubo germinativo y el apresorio, siendo estas claves para explicar las diferencias de adherencia en las especies de *Colletotrichum* estudiadas.

Finalmente, considerando estas diferencias de adherencia entre las especies, éstas pueden ser relacionadas con su prevalencia, en el caso de *C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. gloeosporioides*, especies que presentan una mayor adherencia al tiempo final, con ello tendrían una mayor oportunidad de adherirse al hospedero y por ende de provocar una infección. Esta idea también es apoyada con los resultados de *C. fructicola* y *C. beeveri*, especies con una menor prevalencia y cuyos porcentajes de adherencia son menores. Por lo que aun cuando, este parámetro no es capaz de por sí solo explicar las diferencias de prevalencia para esta especie en particular, es esencial para comprender la epidemiología. Y sería de relevancia bajo condiciones de alta humedad o de lluvias prolongadas en donde adherirse al tejido aseguraría la colonización del hospedero.

Determinación del tiempo de agua libre necesario para la germinación de conidias y formación de estructuras de infección *in vitro* e *in vivo*

Para los estudios del tiempo de agua libre necesaria para la formación de estructuras de infección, se analizaron conidias de las 6 especies en una superficie de poliestireno y en hojas de palto. Los porcentajes de germinación y formación de apresorios se calcularon en base a 100 conidias, las cuales fueron depositadas en la superficie en los tiempos de 2, 4, 8, 16 y 24 horas. Es importante señalar que en esta tesis se demostró que la germinación y formación de apresorios desde las conidias ocurre sobre la superficie de poliestireno, en contraste a estudios previos en especies de *Colletotrichum* relacionadas al palto que afirman que solo es posible inducir estos procesos en presencia de cera y etileno (Podila *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos son respaldados por estudios en *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. graminicola*, en donde se afirma que la hidrofobicidad y la rigidez de la superficie son señales suficientes para activar la ruptura de la latencia y con ello el inicio de los procesos de germinación y formación de apresorios. Concordantemente con ello, es que el estudio de germinación y formación de apresorios en especies de *Colletotrichum* asociadas al palto también dependería de estos dos factores.

En cuanto a la germinación, en términos generales, la emergencia del tubo germinativo comenzó a partir de las 4 horas para todas las especies estudiadas. Resultados similares se han obtenido en *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. capsici* (Kenny *et al.*, 2012; Kraikruan *et al.*, 2008), mientras que para aislados de *C. fructicola* en frutillas se ha observado que la germinación comienza a partir de las 12 horas de incubación (Zhang *et al.*, 2018) En cuanto que, para aislados de *C. gloeosporioides* en frutos de paltas de la variedad Hass y fuerte, se ha observado la germinación a las 48 hrs (Coates *et al.*, 1993; Yakobi *et al.*, 2001), por lo que existe evidencia de una variabilidad en los tiempos de iniciación de la formación del tubo germinativo. Además, luego de 24 horas se observaron para todas las especies los porcentajes más altos de germinación, que variaron entre un 70 y 91%. Frente a esto estudios previos en aislados de la especie *C. acutatum* registraron valores de germinación aproximadamente de un 98%, mientras que por otra parte estudios en *C. gloeosporioides*, mostraron que los porcentajes de germinación más altos se presentaron a partir de las 8 horas (Denner *et al.*, 1986). Por el contrario, Araújo *et al.* (2014), observaron para esta misma especie que los mayores valores de germinación comenzaron a partir de las 5 horas, poniendo en evidencia la variabilidad en la germinación, tanto entre especies como dentro de la misma especie. Del mismo modo, en los ensayos realizados en este estudio se observaron diferencias en los porcentajes de germinación entre especies, siendo especies de una mayor prevalencia como *C. pyricola* y *C. cigarro* las que se mantuvieron constantemente dentro de los porcentajes más altos, mientras que *C. sp.* y *C. beeveri* presentaron, en el tiempo, valores de germinación bajos. Sin embargo, contrariamente a los antecedentes antes expuestos, los tiempos de agua libre requeridos para la germinación entre aislados de la misma especie no presentaron diferencias. Además, de las diferencias encontradas entre las especies es importante mencionar que los tiempos de emergencia del tubo germinativo de *C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. sp.* y *C. beeveri* no habían sido establecidos, por lo que este estudio constituye una primera aproximación en la caracterización del desarrollo de estructuras de infección para estas especies.

Aun cuando como ya se mencionó, no existen estudios previos que establecieran diferencias en el tiempo de la germinación entre especies de *Colletotrichum*, existen diferentes factores que pueden influir en este proceso, entre los que se menciona la concentración conidial, la temperatura, la humedad relativa y el pH (Kenny *et al.*, 2012). En donde la concentración conidial, es descartada debido a que los valores utilizados se encuentran por debajo de 8×10^6 conidias por mL, concentración a la cual el proceso de germinación se ve inhibido (Leite y Nicholson, 1992; Inoue *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 2012). En cuanto a la temperatura de germinación, aun cuando no fue estudiada en esta tesis, la literatura menciona que las temperaturas óptimas de germinación se relacionan directamente con las temperaturas óptimas del crecimiento micelial (Ishida y Akai, 1969). En base a esto, las temperaturas óptimas para las diferentes especies variaron entre los 18 y 23°C, por lo que tampoco la temperatura sería la causa de las diferencias observadas en este estudio. Finalmente, con respecto, al pH, en esta investigación no fue evaluado. Sin embargo, se menciona que los rangos de pH óptimos varían de 6 a 7 para *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Estrada *et al.*, 2000). Por lo que, pese a que estos factores son relevantes, no explican las diferencias observadas. A partir de esta evidencia, se entendería que las diferencias entre las especies estarían dadas por la adaptabilidad y biología propia de cada una.

Para fortalecer el análisis y comprender si estas diferencias pueden ser observadas en la interacción con el hospedero, se realizaron las pruebas de germinación *in vivo*. En donde, al comparar los resultados de germinación sobre poliestireno con los obtenidos en la superficie de hojas de paltos, se observó una disminución de la germinación para todas las especies a las 4 y 8 horas *in planta*. Es importante mencionar que, las especies de menor prevalencia, *C. fructicola* y *C. beeveri*, presentaron la disminución más importante en la germinación sobre las hojas en comparación a los observado sobre poliestireno, con porcentajes de 56 y 55,3 %, respectivamente. En cuanto a esto, se ha reportado que existen diferencias en la germinación entre sustratos, como en el caso de aislados de *C. gloeosporioides* en mango, donde conidias incubadas sobre membranas de celofán presentaron una germinación del 100%, mientras que en hojas y frutos se observaron valores de un 90% y 87%, respectivamente (Wharton y Schilder, 2008). Sin embargo, esto no explica las diferencias marcadas en la germinación para *C. fructicola* y *C. beeveri*, observadas en este estudio. Para esta variación es importante considerar que, en el ensayo, se utilizaron discos de hojas por lo que podría estar relacionado con el daño mecánico producido en el tejido, que como consecuencia provocaría un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y jazmonato (JA), este último con efectos inhibitorios en la germinación de las conidias (Kecpczynska y Król, 2012). Por lo que se sugiere que estas especies podrían tener una menor capacidad de adaptarse a esta respuesta. Interesantemente, ambas especies presentan una menor prevalencia en campo, coherente con porcentajes bajos de germinación resultando en una disminución de la capacidad de infección.

Es así como es posible hipotetizar que estas especies, que requieren un mayor tiempo expuestas a una película de agua para germinar, se verían desfavorecidas bajo condiciones en que la presencia de rocío y alta humedad relativa son bajas, teniendo una menor oportunidad de infectar. Por lo que especies como *C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. gloeosporioides*, serían más competitivas en estas condiciones.

Para profundizar la comprensión de la capacidad de infección de las diferentes especies, los ensayos de germinación se complementaron con la cuantificación de la formación de apresorios, estructura clave en el proceso de penetración y establecimiento de la infección. Los resultados en la formación de apresorios *in vitro* mostraron que el desarrollo de esta estructura comenzó a partir de las 4 horas para *C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. gloeosporioides* y *C. sp.*, mientras que la formación de apresorios comenzó a partir de las 8 horas para las especies *C. fructicola* y *C. beeveri*. Resultados que concuerdan con estudios en *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. graminicola* y *C. capsici*, en el que la formación de apresorios se evidencia a partir de las 3 horas (Apoga *et al.*, 2004; Kraikruan *et al.*, 2008; Kenny *et al.*, 2012). Además, al comparar los porcentajes de formación de apresorios, se observó que *C. cigarro* presentó los valores más altos para la mayoría de los tiempos estudiados. Este resultado se mantiene en las evaluaciones sobre hojas de palto, en donde *C. cigarro* y *C. pyricola*, presentaron los porcentajes más altos de formación de apresorios. Por lo que, se plantea que existe una correlación entre los resultados obtenidos en cuanto a la formación de apresorios en poliestireno y hojas. Sin embargo, es importante considerar que existen reportes que afirman que la formación de apresorios puede extenderse hasta las 48

horas en especies de *Colletotrichum*, por lo que sería necesario establecer si aquellas especies que presentan una menor formación de apresorios, incrementan sus porcentajes en el tiempo al evaluarlas por sobre las 24 horas. Ahora, bien, aun cuando estas fueran capaces de aumentar la presencia de apresorios, los resultados obtenidos permiten interpretar que aquellas especies que germinan y forman esta estructura en un menor tiempo y en mayor proporción se verían favorecidas por sobre aquellas que requieren un mayor tiempo. Tomando relevancia en condiciones de baja o escasa humedad, en donde especies como *C. cigarro*, *C. pyricola*, *C. gloeosporioides* y *C. sp.*, serían más competitivas frente a *C. beeveri* y *C. fructicola*.

Por otra parte, es interesante señalar que se ha reportado que, una vez formada esta estructura, el hongo puede cesar su avance y entrar en un estado de quiescencia, previo a la infección del fruto (Estrada *et al.*, 2000). Esto también ha sido demostrado en frutos de palto, en donde apresorios preformados de *C. gloeosporioides*, que fueron expuestos a temperaturas adversas de 5°C, recuperaron su capacidad de infección luego de 21 días de exposición (Everett *et al.*, 2003). Por lo que al ser una estructura que permite la sobrevivencia a condiciones adversas, aquellas especies como *C. cigarro* y *C. pyricola*, que requieren un tiempo de agua libre menor para germinar y formar apresorios en una mayor concentración, pondrían quedar quiescentes sobre el fruto, lo que les permitiría una ventaja considerable y afirmar su prevalencia en el campo frente a las fluctuaciones de temperatura que puedan presentarse.

Finalmente, los parámetros de germinación y formación de apresorios *in vivo* e *in vitro*, dan cuenta de las diferencias presentes entre las especies estudiadas, donde es posible observar que, para el caso de especies de mayor prevalencia, las conidias tienden a germinar y formar apresorios en un menor tiempo y en una mayor proporción, en comparación a especies como *C. fructicola* y *C. beeveri*. Sin embargo, no serían la causa de la menor frecuencia de *C. sp.* Pese a esto, son factores epidemiológicos de interés que pueden permitir establecer un modelo de las especies que podrían presentarse, en mayor proporción, al considerar las condiciones de humedad del huerto.

Pruebas de patogenicidad sobre hojas y frutos de palto

Para robustecer el análisis *in vitro* e *in vivo* de la germinación y posterior formación de apresorios, en esta tesis se estudió la patogenicidad y la virulencia de las 6 especies de *Colletotrichum* estudiadas. Los resultados obtenidos mostraron que las especies de mayor prevalencia *C. cigarro*, *C. gloeosporioides* y *C. pyricola*, fueron capaces de generar infección en hojas de palto, sin embargo, dentro de las especies con menor prevalencia *C. fructicola* y *C. beeveri*, no se observó el desarrollo de la sintomatología en hojas. Frente a esto, se sabe que las especies de *Colletotrichum* son patógenos tanto de frutos como de hojas, encontrándose especies como *C. aenigma*, *C. alienum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. karstii*, *C. nupharicola*, *C. siamense*, *C. theobromicola* y *C. persea* en hojas de diversos hospederos (Uysal y Kurt, 2020; Sharma *et al.*, 2017). Sin embargo, estudios en *C. gloeosporioides* en paltos, mostraron que los aislados de esta especie no lograron causar infección en hojas, pero si en frutos y peciolos (Giblin, *et al.*, 2010). Asimismo, González *et al.* (2006), observaron que en la caracterización de especies de *Colletotrichum* causantes de

la enfermedad de pudrición amarga y mancha foliar de manzanos, las especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, fueron capaces de infectar frutos, pero no de causar la sintomatología en hojas, aun cuando aislados de *C. acutatum* fueron obtenidos desde este mismo tejido. Resultados similares se obtuvieron en estudios de aislados de *C. fructicola*, en donde se evidenció que aislados capaces de producir la mancha de glomerella en hojas, no eran capaces de infectar los frutos de manzano. Lo que sugiere, que las especies de *Colletotrichum* aisladas desde palto podrían presentar diferencias en los tejidos que infectan, pudiendo ser una causa de la prevalencia diferencial de *C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. gloeosporioides*. Frente a esto, estudios a nivel de transcriptoma en *C. fructicola* han revelado que en las etapas tempranas de la interacción entre hojas de frutilla y el patógeno, se observa un aumento en la expresión de genes que codifican enzimas que facilitan la degradación y remodelación de la pared celular de las plantas (pectinasas de las familias glucósido hidrolasas, carbohidrato esterasas y pectoliasas). Interesantemente, también se observó un aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas inactivadoras de enzimas, entre las que se detectaron inhibidoras de glucanasas, de la familia glicosil hidrolasa del hospedero, además, de genes que codifican proteínas que se unen a quitinasa, compuesto central en la respuesta de defensa de la planta (Zhang *et al.*, 2018). Asimismo, Yakoby *et al.* (2001), al generar una disrupción del gen *pelB* en aislados de *C. gloeosporioides*, observaron inhibición en la producción de la pectato liasa B y bajas en la actividad de la pectin liasa y pectato liasa, lo que tuvo como resultado una disminución considerable en el diámetro de la lesión de frutos de palto de la variedad fuerte. A su vez, los mutantes indujeron niveles significativamente altos de la actividad de la fenilalanina amonio liasa y el dieno antifúngico en el hospedero, lo que tendría como consecuencia una mayor resistencia a la infección. Por lo que, esta evidencia apunta a que el patógeno utiliza estas estrategias para evadir el reconocimiento por parte del hospedero, evitando la degradación celular (Zhang *et al.*, 2018). De esto se desprende la hipótesis de que las diferentes especies de *Colletotrichum* podrían presentar diferencias en el arsenal enzimático que forma parte del proceso de infección. Esta idea es respaldada en estudios en que se ha mencionado que entre especies de *C. fructicola* que causan pudrición amarga y mancha foliar en manzano, existen diferencias en la actividad enzimática de las conidias, en donde aislados que son capaces de infectar ambos tejidos, presentan una mayor actividad para degradar componentes de la pared celular de la planta, en comparación con aislados que solo son capaces de producir mancha foliar (Velho *et al.*, 2017). Resultados similares, se han observado en la actividad enzimática de *C. fioriniae*, *C. noveboracense* y *C. chrysophilum*, en donde se encontraron diferencias en la actividad celulolítica, lipolítica y amilolítica (Kodadadi *et al.*, 2020). Por lo que especies como *C. fructicola* y *C. beeveri* que no son capaces de infectar hojas, podrían tener una batería enzimática diferencial al resto de las especies de *Colletotrichum*, que no le permitiría colonizar y establecer una infección en el tejido.

Por otra parte, es importante mencionar que, las diferencias observadas en los niveles de infección por especie pueden relacionarse con la respuesta de defensa activa de la planta. Si bien, fue posible observar la formación de apresorios en el tejido de hojas para las especies *C. fructicola* y *C. beeveri*, menos abundantes en campo, ambas fueron incapaces de generar infección, por lo que el patógeno podría ser frenado por los mecanismos de defensa del hospedero. Por ejemplo, en cultivares resistentes de frutillas a la antracnosis se observó que en presencia de *C. gloeosporioides*, aumentó la expresión de genes, proteínas y metabolitos directamente relacionados con la respuesta de la planta al patógeno, tales como PR1, CNGC

(canales conductores de Ca⁺) y RBHO, asociada con la producción de especies radiactivas de oxígeno (Wang *et al.*, 2017). De igual forma, estudios en la interacción palta, quitosano y *Colletotrichum*, determinaron que frente a la infección por *C. gloeosporioides* se gatilla un aumento en la expresión de factores de transcripción, genes de defensa (proteínas PR y metabolitos secundarios), beta glucanasas, cambios del potencial redox y proteólisis, también relacionados en los mecanismos de respuesta del hospedero (Xoca-Orosco *et al.*, 2017). Por lo que, la respuesta de la planta al patógeno es un factor importante para considerar que, para el caso de este estudio, estaría siendo efectivo para frenar la infección de las especies *C. beeveri* y *C. fructicola* en hojas.

En contraste a los resultados obtenidos en hojas de palto, la patogenicidad en frutos evidencio que las seis especies estudiadas fueron capaces de generar infección, siendo *C. pyricola* la especie con mayor virulencia, mientras que *C. beeveri*, fue la que presentó el menor diámetro de lesión. Las demás especies no presentaron diferencias en el daño generado por el patógeno por lo que la baja prevalencia de *C. beeveri* podría estar explicada por el conjunto de parámetros estudiados, que finalmente se evidencian en una menor virulencia por parte de este patógeno. Sin embargo, no explicarían la menor prevalencia de *C. sp.* y *C. fructicola*. Por lo que no se presentan diferencias importantes en la patogenicidad y virulencia de frutos que explique la prevalencia de unas especies sobre otra.

Los estudios de patogenicidad en hojas permitieron corroborar la capacidad de las especies en colonizar un nicho en la planta distinto al fruto. Por lo que existe la posibilidad de que aquellas especies que son capaces de infectar hojas podrían mantenerse en el campo a lo largo de la temporada y constituir inoculo para próximas infecciones. Interesantemente, se observó que en las hojas inoculadas con *C. pyricola* que no presentaban sintomatología, presentaba el desarrollo de micelio superficial. Al observar el crecimiento de micelio a nivel microscópico, se evidencio la presencia de apresorios en las hifas, por lo que la estrategia de infección de *C. pyricola* en este tejido podría estar relacionada con el estilo de vida hemibiotrofo del patógeno, adquiriendo los nutrientes para sobrevivir del hospedero sin afectar al tejido. Además, las observaciones sobre estas hojas permitieron detectar la formación de masas de conidias sobre el micelio. Resultados similares se obtuvieron al estudiar los mecanismos de infección de *C. acutatum* en la variedad resistente de arándano Elliot, en donde evidenciaron el crecimiento superficial del micelio sobre la epidermis (Warton y Schilder, 2008). Micelio sobre el cual se desarrollaron masas de conidias, lo que da cuenta de que aun cuando la infección no afectaría los frutos de la misma forma que en variedades sensibles, el hongo es capaz de producir esporas que pueden colonizar nuevos tejidos.

Finalmente, de los ensayos de patogenicidad se desprende que aquellas especies que son capaces de colonizar hojas tendrían una mayor competitividad frente a especies que se encuentran limitadas a la infección de frutos, lo que coincide con la posibilidad de encontrarlas con mayor frecuencia en el huerto, como en el caso de *C. pyricola*, *C. cigarro* y *C. gloeosporioides*. Sin embargo, es importante considerar que la capacidad de infección de las especies en este estudio podría ser afectada por procesos de senescencia naturales de la

hoja, por lo que es importante realizar estudios en hojas *in planta*, que permitan comprobar la capacidad de las diferentes especies de *Colletotrichum* para infectar tejidos de palto.

Efecto de la temperatura en el crecimiento micelial

En este estudio, se analizaron parámetros epidemiológicos que influyen en el desarrollo de la infección, entre ellos el efecto de la temperatura en el crecimiento micelial. Los resultados obtenidos señalan que los óptimos de temperatura para todas las especies variaron entre los 20 y 28°C, resultados similares se a los obtenidos en especies de *Colletotrichum* afectando frutillas y frutos de palto (Han *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017). Además, se observó variabilidad en las temperaturas mínimas de crecimiento, en contraste con estudios en especies de *Colletotrichum* en frutillas, en donde, todas las especies estudiadas presentaron una temperatura mínima de desarrollo de 10°C (Han *et al.*, 2016). En este estudio las temperaturas mínimas de crecimiento micelial se encontraron entre los 2,5°C de *C. pyricola* y los 5,3°C correspondiente a *C. gloeosporioides*, lo que podría relacionarse con la capacidad de generar las diferentes estructuras de infección. Por ejemplo, se ha reportado en aislados de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* causando antracnosis en el palto, que la germinación de conidias de *C. acutatum* se vio mermada en un 50% en temperaturas entre los 4 y 5 °C, mientras que para *C. gloeosporioides* la temperatura a la cual la germinación se redujo en un 50% correspondió a los 7°C. Otro resultado interesante de esta investigación es que, los frutos en que se formaron apresorios y fueron expuestos a temperaturas de almacenamiento de 5,5°C, fueron capaces de producir pudrición (Everett, 2003).

La temperatura es un factor que afecta directamente la epidemiología de los patógenos (Han *et al.*, 2016). En consecuencia, la adaptación es clave para el desarrollo y establecimiento de la enfermedad. Respecto a las especies de *Colletotrichum* se menciona que, al ser propias de climas tropicales requerirían temperaturas altas para su óptimo desarrollo (Xie *et al.*, 2010; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020). Sin embargo, en este estudio se observó que las especies se adaptan a los rangos de temperatura presente en los huertos en los que se presenta la antracnosis, en donde la temperatura mínima registrada para el año 2020 fue para Isla de Maipo de -4,1°C, para Santo Domingo de -0,1°C y en Peumo de -0,8°C (DGAC,2020), valores de temperatura mínima que afectarían el desarrollo de todas las especies. En cuanto a la temperatura máxima anual registrada para estas localidades fue de 30,6°C, 35,5°C y de 37,4°C, respectivamente, lo que se ajusta a la temperatura máxima de desarrollo de las especies.

Por otra parte, se determinó que la especie *C. pyricola*, presenta temperaturas de desarrollo mínimo de 2,5°C, por lo que podría responder de mejor manera a bajas temperaturas, lo que podría explicar por qué se encuentra entre las más prevalentes. Sin embargo, esto no es homologable para el caso de *C. cigarro*, para el cual se observó que la temperatura mínima de desarrollo fue de 5,3°C, la más alta entre las especies estudiadas. Además, el estudio demostró que *C. fructicola*, es capaz de adaptarse a temperaturas más altas de desarrollo, lo que resulta coherente con los países en donde ha sido reportado afectando al cultivo del palto (Australia, Colombia, Israel y México) (Weir *et al.*, 2012; Gañán *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017; Fuentes-Aragón *et al.*, 2018). En Chile podría ser encontrada en sectores ubicados hacia el interior norte del país donde el régimen de temperaturas es mayor, sin embargo, los antecedentes ya señalados implican que las condiciones en las que se vería favorecida esta

especie también dependería de una alta humedad o incidencia de precipitaciones. En cuanto a esto, si bien, la temperatura podría influir directamente en la prevalencia de las especies, los datos no lo correlacionan directamente, en contraste, la formación de estructuras de infección evaluadas permite sugerir que estos parámetros si influyen en la prevalencia de las especies.

Es así como, en los parámetros epidemiológicos estudiados, es evidente que existe una variabilidad entre especies de *Colletotrichum* que afectan al palto en Chile. Siendo la adherencia, germinación, formación de apresorios y patogenicidad en hojas, diferencial para especies con una mayor prevalencia, como *C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. gloeosporioides*, en contraste a *C. fructicola* y *C. beeveri*. Sin embargo, ninguno de los parámetros estudiados explica una menor presencia de *C. sp.*, especie que posee un comportamiento similar a las especies que se encuentran en una mayor proporción. Frente a esto, es importante considerar que esta especie, es la primera detección del complejo *C. dematium*, afectando al palto además de encontrarse presente solamente en uno de los dos huertos de Isla de Maipo estudiados (Bustamante, 2019), por lo que su presencia podría estar limitada por las características geográficas del huerto, lo que explicaría porque, pese a que su comportamiento se agrupa entre las más prevalentes, su abundancia en comparación a otros huertos se ve mermada.

Por otra parte, las diferencias encontradas y su relación con las especies de mayor y menor frecuencia podrían permitir explicar la abundancia diferencial de estas y su competitividad bajo las condiciones de campo. Siendo especies con una mayor prevalencia capaces de infectar, tanto hojas como frutos, bajo un menor tiempo de exposición a agua libre, lo que le permitiría tener una mayor ventaja frente a condiciones de escasa humedad, pero además, los resultados obtenidos entregan la premisa que en aquellos campos en que la humedad en el huerto es constante, condiciones bajo las cuales se ha evidenciado una alta carga de inóculo, existiendo condiciones de temperatura que lo permitan, las infecciones serían frecuentes a lo largo de la temporada.

Finalmente, los resultados de esta tesis corresponden a una aproximación a la biología de las especies de *Colletotrichum* presentes en paltos en Chile, y permiten explicar en parte la variabilidad presente en el huerto, a través de la relación entre la prevalencia y los parámetros epidemiológicos estudiados. Aún quedan interrogantes por resolver que permitan abordar la relación estrecha entre ambos y a su vez comprender la epidemiología de la enfermedad en el huerto, para poder desarrollar estrategias de manejo apropiadas. La presencia de 10 especies complica el manejo efectivo de la enfermedad ya que ellas pueden presentar comportamientos diferenciales frente a los fungicidas, por lo que el manejo de la enfermedad debería enfocarse de acuerdo con la composición de especies presentes en el huerto. Por ejemplo, se ha reportado que *C. fiorinae* presenta una baja sensibilidad a los fungicidas trifloxystrobin, azoxystrobin y fluopyram, pero es sensible a metconazole y penthiopyrad (Lichtemberg *et al.*, 2018). Mientras que *C. gloeosporioides* y *C. karstii* fueron sensibles a estrobilurinas (pyraclostrobin, trifloxystrobin y azoxystrobin), fluazinam y fenbuconazole, y a la vez resistentes a fluopyram (Mayorquin, 2017). Por ello, para generar soluciones efectivas en el control de la antracnosis de la palta, es necesario profundizar los análisis para comprender a cabalidad la biología y el comportamiento de la enfermedad en el campo.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la hipótesis y objetivos planteados, los resultados de esta investigación permiten concluir lo siguiente:

El tiempo mínimo necesario para la formación de estructuras de infección para todas las especies de *Colletotrichum* estudiadas es de 4 horas.

La patogenicidad de *Colletotrichum* en palta es especie dependiente. Las especies *C. cigarro* y *C. pyricola* presentan la mayor virulencia en hojas y frutos, respectivamente. A su vez, *C. fruticola* y *C. beeveri* son incapaces de producir infecciones en hojas.

Las especies de *Colletotrichum* aisladas de paltas presentan temperaturas óptimas de desarrollo entre 18 y 23,8 °C. *Colletotrichum pyricola* es la especie que presenta la menor temperatura de desarrollo, mientras que *C. fruticola* se adapta en mejor medida a temperaturas altas.

La información obtenida en esta tesis indica que las especies de *Colletotrichum* presentan diferencias en su desarrollo e interacción con el palto. Este estudio sugiere que las especies con mayor prevalencia: *C. cigarro*, *C. pyricola* y *C. gloeosporioides*, son más competitivas frente a especies menos prevalentes. Sin embargo, no explica la menor frecuencia de *C. sp.*, la cual de acuerdo con su comportamiento se agrupa junto a las especies más prevalentes.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. Burlington, MA, USA.
- Alkan, N., G. Friendlander, D. Ment, D. Prusky y R. Fluhr. 2014. Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. *New Phytologist* 205(2):801-15.
- Araújo L., A.E. Concalvez y M.J. Stadnik. 2014. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytoparasitica* 42(5):631-640.
- Armesto, S., F. Concalvez, F. Monteiro y M. Sobral de Abreu. 2019. Exoenzymes as a pathogenicity factor for *Colletotrichum gloeosporioides* associated with coffee plants. *Mycology* 45(4): 368-373.
- Barimani, M., S.J. Pethybridge, N. Vaghefi, F.S. Hay, y P.W.J Taylor. 2013. A new anthracnose disease of pyrethrum caused by *Colletotrichum tanacetii*. *Plant Pathology* 62: 1248-1257.
- Bustamante, M.I. 2019. Caracterización de aislados de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en paltas. 43 p. Tesis de Magister. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Santiago, Chile.
- Cannon, P.F., U. Damm, P.R. Johnston, and B.S. Weir. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181–213.
- Chaky J., K. Anderson, M. Moss y L. Vaillancout. 2001. Surface hydrophobicity and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola*. *Biochemistry and cell biology* 91(6) 558-564.
- Coates L.M, I.F. Muirhead, J. Irwin, D. Gowanlock. 1993. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. *Mycological Research* 97 (11) 1363–70.
- Da Silva, L., H.L. Alvarado, H.L. Nunes, M. Ferreira y M. Quiroz. 2020. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104(5): 1891-1904.
- Defilippi, B., Ferreyra, R. y Rivera, S. 2015. Optimización de la calidad de palta Hass: Herramientas para enfrentar nuevos desafíos. 4^a edición. Instituto de Investigación Agropecuarias. Boletín INIA 307. Santiago, Chile.

Denner, F., J.M. Kotzé y J. Putterill. 1986. The effect of temperature on spore germination growth and appressorium formation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Dothiorella aromatica*. South African Avocado Growers' Association Yearbook 9:19-22.

Dirección General de Aeronautica Civil (DGAC). 2020. Boletín climatológico anual. Disponible en: <https://climatologia.meteochile.gob.cl/> (Consultado el 20 de junio de 2021).

Dodd, J. C., A.B. Estrada, J. Matcham, P. Jeffries, and M.J. Jeger. 1991. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. *Plant Pathology* 40(4) 568–575.

El-Akhal, M., T. Colby, J.M. Cantoral, A. Harzen, J. Schmidt, F. Fernández- Acero. 2013. Proteomic analysis of conidia germination in *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* 195:227–246.

Estrada, A.B., J.C. Dodd., and P. Jeffries. 2000. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* 49: 608-618.

Everett, K.R. 2003. The effect of low temperatures on *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing body rots of avocados in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 32:441–448

Fernando, T.H.P.S., C.K., Jayasinghe, and R.L.C. Wijesundera. 2000. Factors affecting spore production, germination and viability of *Colletotrichum acutatum* isolates from *Hevea brasiliensis*. *Mycological Research* 104 681–685.

Fitzell, R.D. 1987. Epidemiology of anthracnose disease of avocados. South African Avocado Growers' Association Yearbook 10:113-116.

Fuentes-Aragón, D., S.B. Juárez-Vazquéz, M. Vargas-Hernandez, and H.V. Silva-Rojas. 2018. *Colletotrichum fructicola*, a member of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato*, is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. "Hass". *Mycobiology* 46(2): 90-100.

Fuentes-Aragón, D., H. Silva-Rojas, V. Guarnaccia J.A. Mora-Aguilera, S. Aranda-Ocampo, N. Bautista-Martinez and D. Téliz-Otíz. 2020. *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit in Mexico: Current status. *Plant Pathology* 69(8) 1-16.

Gañán, L., E. Álvarez, y J. Castaño-Zapata. 2015. Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banana, mango y tomate de árbol. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 39(152):339-347.

- Gasking, R.E., y K.A. Pathan. 2006. Characterizing plant surface and adjuvant interactions to improve pesticide spray retention and coverage on avocado. New Zealand avocado growers' association annual research report 6: 63-70.
- Gonzalez, E., T.B. Sutton, y J.C. Correll. 2006. Clarification of the etiology of glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity test. *Phytopathology* 21:982-992.
- Hacquard, S., S. Spaepen, R. Garrido, y P. Schulze-Lefert. 2017. Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annal Review of Phytopatology* 55: 565-589.
- Han, Y.C., X.G. Zeng, y F.Y. Xiang. 2016. Distribution and characteristics of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose of strawberry in Hubei, China. *Plant Disease* 100(5) 996-1006.
- Hartung, J.S., C.L., Burton, and D.C., Ramsdell. 1981. Epidemiological studies of blueberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 71(4): 449-453.
- He, P., Y. Wang, X. Wang, X. Zhang y C. Tian. 2017. The mitogen-activated protein kinase CgMK1 governs appressorium formation, melanin synthesis, and plant infection of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Frontiers in Microbiology* 8:2216.
- Hunupolagama, D.M., R.L.C. Wijesundera, N.V. Chandrasekharan, W.S.S. Wijesundera, H.S. Kathriarachchi, and T.H.P.S. Fernando. 2015. Characterization of *Colletotrichum* isolates causing avocado anthracnose and first report of *C. gigasporum* infecting avocado in Sri Lanka. *Plant Pathology and Quarantine* 5(2):132-1.
- Hutchison, K., R. J. Green, P.S. Wharton y R. J. O'Connell. 2000. Identification and localization of glycoproteins in the extracellular matrices around germ-tubes and appressoria of *Colletotrichum* species. *Mycological Research* 106(6): 729-736.
- Inoue, M., N. Mori, H. Yamanaka, T. Tsurushima, H. Miyagawa, y T. Ueno. 1996. Self-germination inhibitors from *Colletotrichum fragariae*. *Journal of Chemical Ecology* 22: 2111-2122.
- Ishida, N y S. Akai. 1969 Relation of temperature to germination of conidia and appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Mycologia* 61(2): 382-386.
- Jayawardena, R.S., K.D. Hyde, U. Damm, L. Cai, M. Liu, X.H. Li, et al. 2016. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere* 7(8):1192-1260.
- Kenny, M.K., V.J., Galea, y T.V. Price. 2012. Germination and growth of *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee in Papua New Guinea and their pathogenicity to coffee berries. *Australasian Plant Pathology* 41:519-528.

Kępczyńska, E., y P. Król. 2012. The phytohormone methyl jasmonate as an activator of induced resistance against the necrotroph *Alternaria porri* f. sp. *solani* in tomato plants. *Journal of Plant Interaction* 7(4): 307-315.

Kim, Y.K., D. Li y P.E. Kolattukudy. 1998. Induction of Ca²⁺-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *Journal of Bacteriology* 180(19) 5144–5150.

Kimaru, S.K., E. Monda, R. C. Cheruiyot, J. Mbaka, y A. Alakonya. 2018. Sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from diseased avocado fruits to selected fungicides in Kenya. *Advances in Agriculture* 18:158-160.

Kraikruan, W., S. Sangchote y S. Sukprakarn. 2008. Effect of capsaicin on germination of *Colletotrichum capsici* conidia. *Natural Science* 42 (3): 417-422.

Kodadadi, F., J.B. González, P.L. Martin, E. Giroux, G.J. Bilodeau, K. A. Peter, *et al.* 2020. Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of *C. noveboracense* sp. nov. *Scientific Reports* 10(1): 1-19.

Kubo Y., y Y. Takano. 2013. Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of General Plant Pathology* 79: 233–242.

Latorre, B. 2018. Frutales de clima tropical y subtropical: Palto. p 350-352. Compendio de las enfermedades de las plantas. 704 p. Ediciones UC, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile.

Leandro, S., M.L. Gleason, F.W. Nutter, S.N, Wegulo, P.M. Dixon. 2003. Influence of temperature and wetness duration on conidia and appressoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology* 93:513–520

Leite, B., y R.L. Nicholson. 1992. Mycosporine-alanine: A self- inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology* 16:76-86

Liao, C.Y., M.Y. Chen, Y.K. Chen, K.C. Kou, K.R. Chung, *et al.*, 2012. Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum* spp. *Plant Pathology* 61:262–270.

Lichtemberg, P.S.F., G. Gusella, H. Doussoulin, T. Carraro, D.G. Felts, and T.J. Michailides. 2018. Sensitivity of eight fungicide chemical groups for *Colletotrichum fioriniae*, the cause of anthracnose of pistachio in California. International Congress of Plant Pathology (ICPP). Boston, MA, USA.

Lopes, L., H. L. Alvarado, H.L. Nunes, M. Ferreira y M.V. Queiroz. 2020. *Colletotrichum*: Species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(5): 1891-1904.

Mayorquin, J.S. 2017. Management of canker and dieback diseases of citrus and sycamore in California. 161 p. PhD dissertation. University of California, Riverside, CA, USA.

Mayorquin, J.S., T. Mohamed, B.B. Peacock, F.P. Trouillas, G.W. Douhan, C. Kallsen, and A. Eskalen. 2019. Identification, pathogenicity, and spore trapping of *Colletotrichum karstii* associated with twig and shoot dieback in California. *Plant Disease* 103(5): 1464-1473.

Mercure, E.W., H. Kunoh y R.L. Nicholson. 1994a. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: A requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 407-420.

Mercure, E.W., B. Leite y R.L. Nicholson. 1994b. Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 421-440.

Mercure, E.W., H. Kunoh y R.L. Nicholson. 1995. Visualization of materials released from adhered, ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 121-135.

Nelson, S.C. 2008 Anthracnose of avocado. *Plant Disease* 58: 1-6.

Nicaise, V., M. Roux, y C. Zipfel. 2009. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: Pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiology* 150:1638–1647

O'Connell, R., C. Herbert, S. Sreenivasaprasad, M. Khatib, M.T. Esquerré-Tugayé, and B. Dumas. 2004. A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17(3): 272-282

O'Connell, R., N.A. Pain, K. Hutchison, G.L. Jones y J.R. 1996. Green ultrastructure and composition of the cell surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Genetics and Biology* 18(2) 204-212.

Ohtaki, S., H. Maeda, T. Takahashi, Y. Yamagata, F. Hasegawa, *et al.* 2006. Novel hydrophobic surface binding protein, HsbA, produced by *Aspergillus oryzae*. *Applied Environmental Microbiol* 72: 2407–2413.

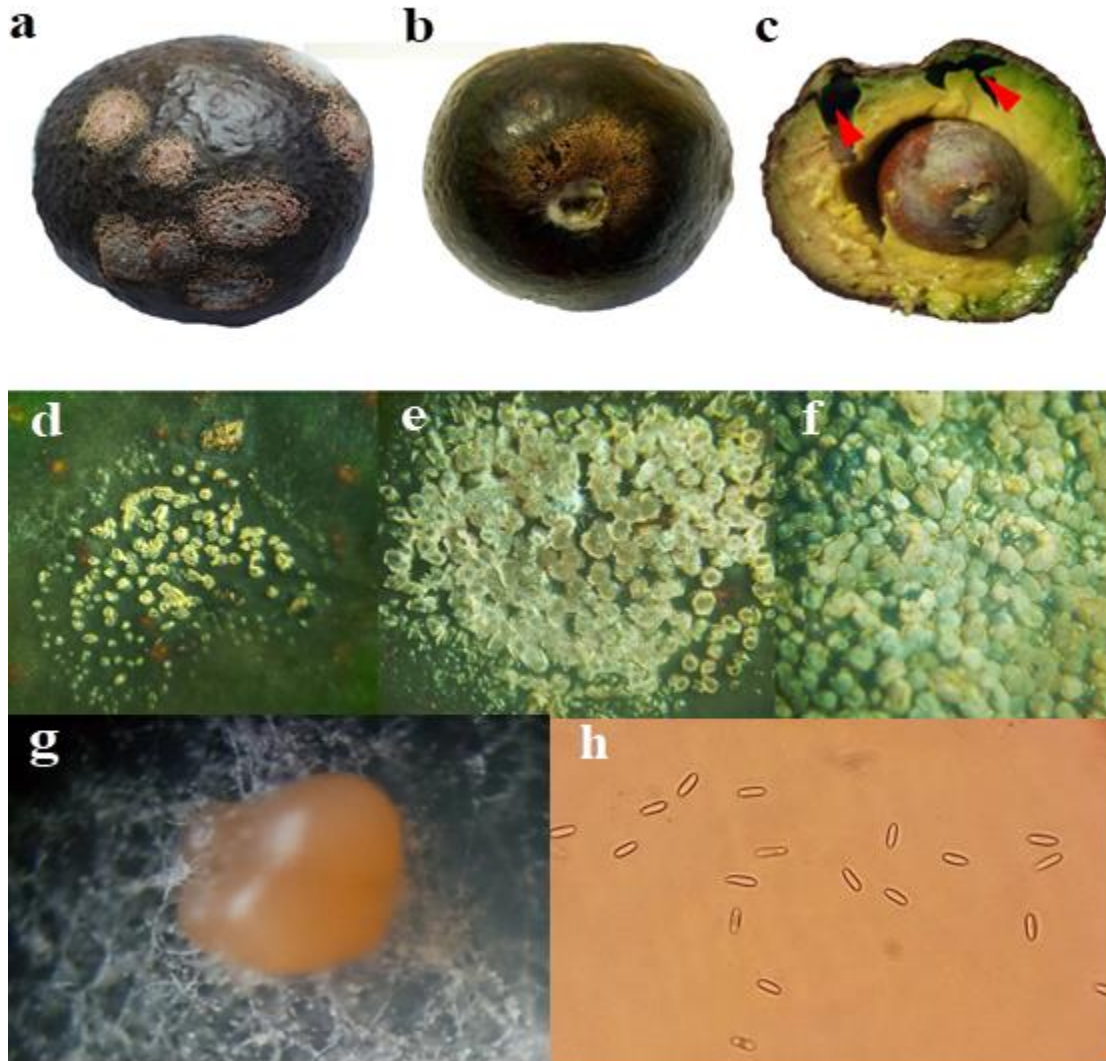
Pain, N.A. R.J. O'Connell, J.A. Bailey and J.R. Green. 1992. Monoclonal antibodies which show restricted binding to four *Colletotrichum* species: *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. orbiculare* and *C. trifolii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 111- 126.

Perfect, S.E., H.B Hughes, R.J. O'Connell and J.R. Green. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198.

- Podila, G., M. Rogers, and P. Kolattukudy. 1993. Chemicals signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology* 103: 267-272.
- Prusky, D., N. Alkan, T. Mengiste, and R. Fluhr. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology* 51:155-76.
- Rawlings S.L, R.J. O'Connell and J. R. Green. 2007. The spore coat of the bean anthracnose fungus *Colletotrichum lindemuthianum* is required for adhesion, appressorium development and pathogenicity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70:110-119.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Disponible en: <http://www.R-project.org> (Consultado: 20 de agosto de 2020).
- Sanders, G.M., L. Korsten, and F.C. Wehner. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 106:745-752.
- Sela-Buurlage M.B., L. Epsein y R.J. Rodríguez. 1991. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 345-342
- Sharma, G., M. Maymon, and S. Freeman. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific Reports* 7:15839.
- Sharon A., S. Barhoom, and I. Neshet. 2008. Cell cycle and cell death are not necessary for appressorium formation and plant infection in the fungal plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *BMC Biology* 6: 6-9.
- Siddiqui, Y., and A. Ali. *Colletotrichum gloeosporioides* (anthracnose). 2014. p337-364. In Bautista-Baños, S. (ed). Post-harvest Decay. Academic Press, San Diego, California, Estados Unidos. 373 p.
- Silva, D.N., W. Crous, P. Ades, K.D. Hyde and P.W.J. Taylor. 2017. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews* 31: 155-168.
- Silva, C.F.D., and S.J. Michereff. 2013. Biology of *Colletotrichum* spp. and epidemiology of the anthracnose in tropical fruit trees. *Revista Caatinga* 26(4): 130-138.
- Stanley M., M. Callow, R. Perry, R.S. Randall, R. Smith, et al. 2002. Inhibition of fungal spore adhesion by zosteric acid as the basis for a novel, nontoxic crop protection technology. *Disease Control and Pest Management* 92(4) 378-383.

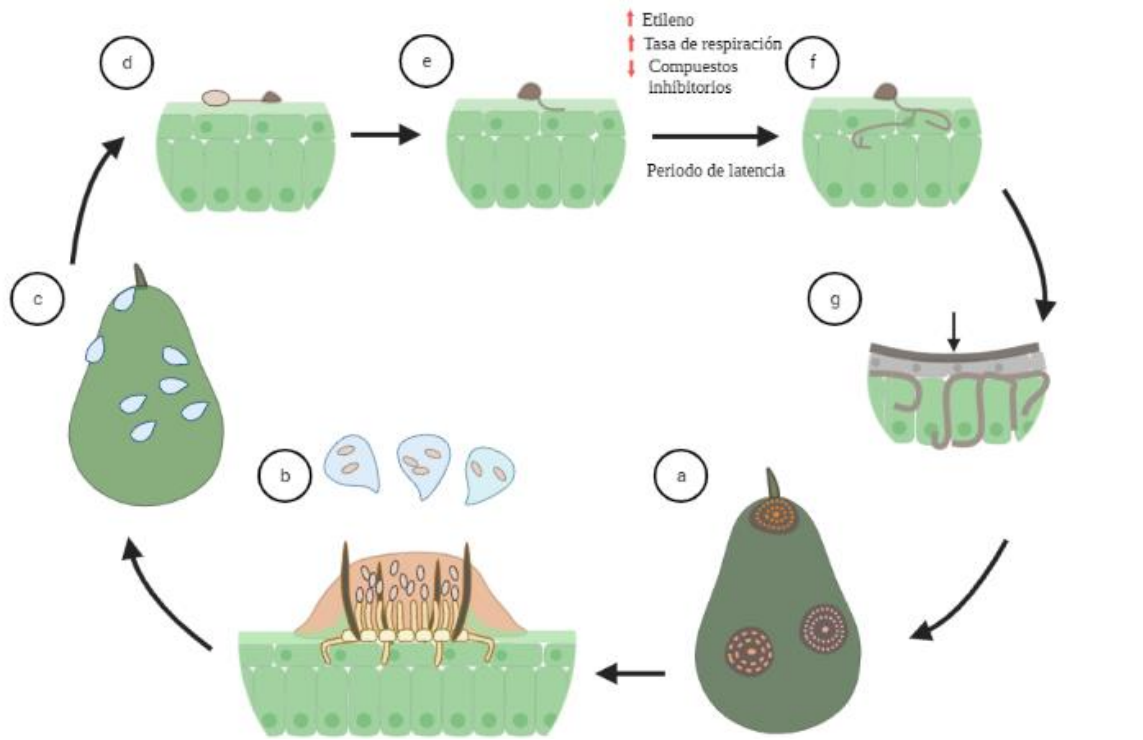
- Takano, Y., K., Taisei, Y. Kubo, J.E. Hamer, K. Mise, et al. 2000. The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(4) 374–383.
- Wang, F., F. Zhang, M. Chen, Z. Liu, Z. Zhang, J. Fu, et al. 2017. Comparative transcriptomics reveals differential gene expression related to *Colletotrichum gloeosporioides* resistance in the octoploid strawberry. *Frontiers in Plant Science* 8:1-10
- Weir, B. S., P.R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73 (1):115-180.
- Wharton, P.S. and A.C. Schilder. 2008. Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit. *Plant Pathology*. 57: 122-134.
- Xie, L., J.Z., Zhang, Y. Wan, y D.W. Hu. 2010. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. *Journal of Zhejiang University Science B* 11:61-70
- Xoca-Orosco, L.A., E. Cuellar-Torres, S. Gonzalez-Morales, P. Gutiérrez-Martínez, U. López-García, et al. 2017. Transcriptomic analysis of avocado Hass (*Persea americana* Mill) in the interaction system fruit-chitosan-*Colletotrichum*. *Frontiers in Plant Science* 8:1-12.
- Yakobi, N., D. Beno-Moualem, N.T. Keen, A. Dinoor, O. Pines, y D. Prusky. 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit–fungus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(8) 988-995.
- Yong, H.Y., F. Abu, R. Illias, N.M. Mahai y A. Murad. 2013. Cgl-SLT2 is required for appressorium formation, sporulation, and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Brazilian Journal of Microbiology* 44 (4): 1241-1250.
- Young, D. H. y H. Kauss. 1984. Adhesion of *Colletotrichum lindemuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and to polystyrene. *Applied and Environmental Microbiology* 47:616-619.
- Zelinger E., C.R. Hawes, S.J. Gurr, y F.M. Dewey. 2006. Attachment and adhesion of conidia of *Stagonospora nodorum* to natural and artificial surface. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68: 209-215.
- Zhang, L., X. Huang, C. He, Q. Zhang, X. Zou, et al. 2018. Novel fungal pathogenicity and leaf defense strategies are revealed by simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum fructicola* and strawberry infected by this fungus. *Frontiers in Plant Science* 9: 1- 19.

APÉNDICES



Apéndice 1. Sintomatología de antracnosis en frutos maduros de palto de la variedad Hass.

a) fruto con desarrollo de acérvulos en la superficie en donde se aprecian múltiples lesiones. b) desarrollo de una lesión y acérvulos en la zona peduncular. c) fruto con cavidades (flechas de color rojo) provocado por el avance del hongo en la pulpa. d, e y f) emergencia de los acérvulos a través la epidermis del fruto. g) masa de conidias de tonalidad anaranjada sobre un acérvulo y h) conidias de *Colletotrichum* sp.

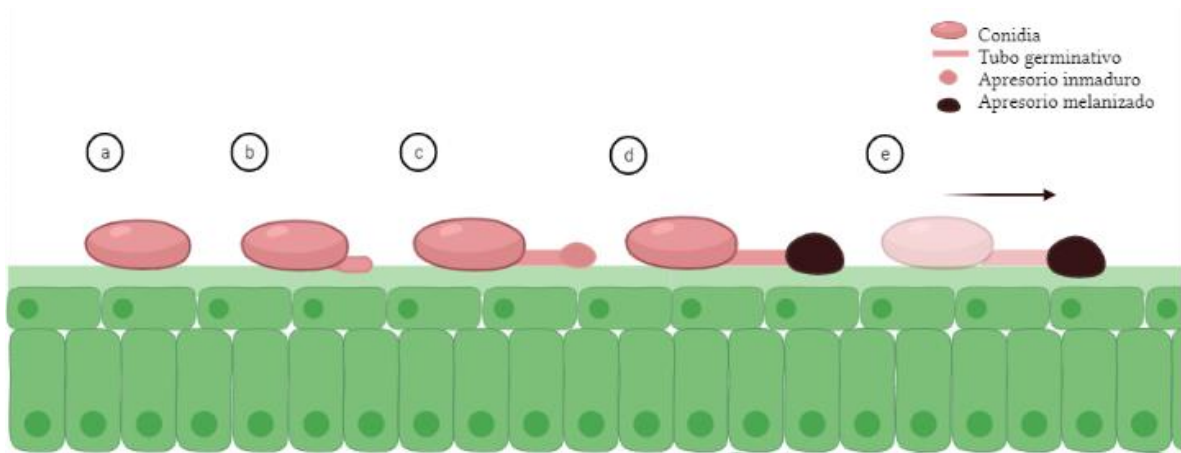


Apéndice 2. Desarrollo de estructuras de infección de *Colletotrichum* sobre frutos de palto:

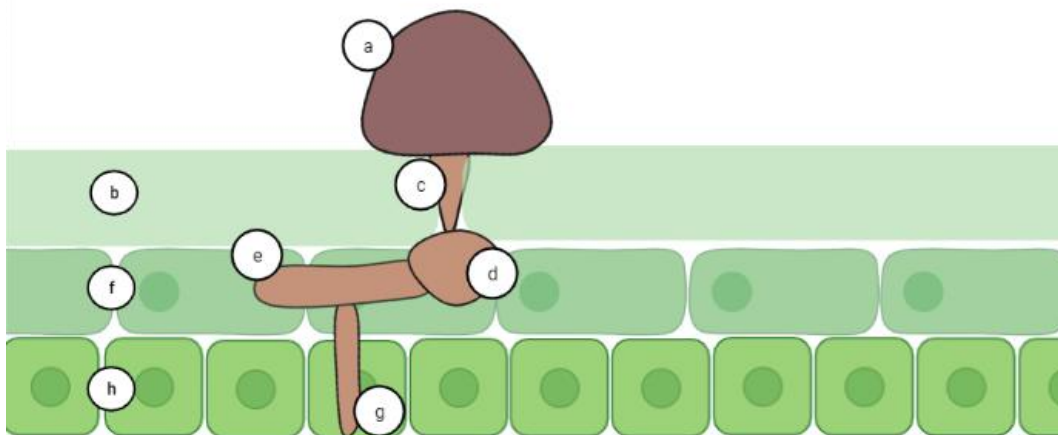
- a) Desarrollo de la sintomatología externa en paltas en donde la tonalidades rosadas y anaranjadas corresponde a los acervulos; b) Estructura del acervulo, en donde se desarrollan las conidias y su posterior dispersión a través de agua c) Dispersión de conidias a través del rocío en frutos de palto; d) y e) Estadios iniciales de la infección por conidias una vez alcanzada la superficie del hospedero. f) avance de la infección posterior al periodo de latencia y g) inicio fase necrotrófica.

Apéndice 3. Complejos y especies de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en paltas (Hunupolagama *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2017; Bustamante, 2019; Fuentes-Aragón *et al.*, 2020).

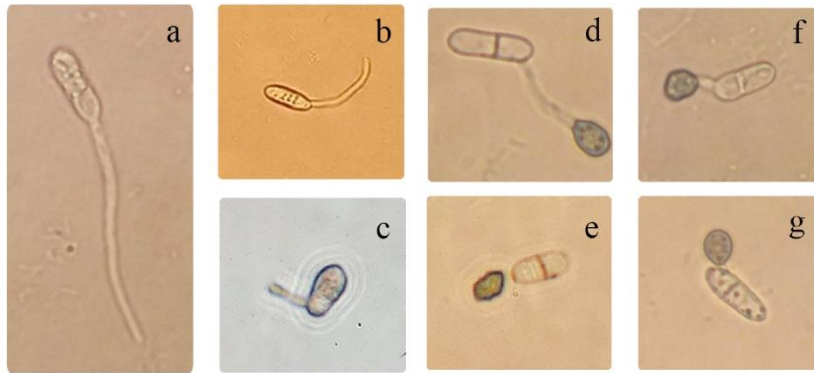
Complejos de especies					
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>C. boninense</i>	<i>C. gigasporum</i>	<i>C. dematium</i>	<i>C. magnum</i>
<i>C. aenigma</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>C. beeveri</i>	<i>C. gigasporum</i>	<i>C. sp.</i> (anteriormente <i>C. anthrisci</i>)	<i>C. sp.</i>
<i>C. alienum</i>	<i>C. fioriniae</i>	<i>C. boninense</i>			
<i>C. aotearoa</i>	<i>C. godetiae</i>	<i>C. karstii</i>			
<i>C. chrysophilum</i>	<i>C. nymphaeae</i>				
<i>C. cigarro</i>	<i>C. pyricola</i>				
<i>C. fructicola</i>	<i>C. simmondsii</i>				
<i>C. gloeosporioides</i>					
<i>C. jiangxiense</i>					
<i>C. nupharicola</i>					
<i>C. perseae</i>					
<i>C. queenslandicum</i>					
<i>C. siamense</i>					
<i>C. theobromicola</i>					
<i>C. tropicale</i>					



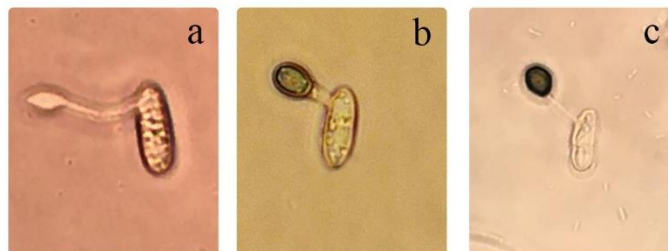
Apéndice 4. Etapas pre-infección en *Colletotrichum* spp.: a) adherencia inicial de la conidia al tejido vegetal; b) inicio de la germinación; c) comienzo de la diferenciación del apresorio; d) melanización del apresorio; y e) paso del contenido celular desde la conidia hasta el apresorio, el cual se señala a través de la flecha de color negro.



Apéndice 5. Esquema de la histología de las estructuras de infección de *Colletotrichum* en fruto de palto, en donde a) apresorio melanizado sobre la superficie de la cutícula (b) del fruto. c) hifa de infección que con ayuda de la presión de turgencia rompe la cutícula. d) vesícula de infección. e) hifa primaria de infección, colonizando células epidermales (f). g) hifa secundaria necrotrofica y (h) células del tejido del fruto



Apéndice 6. Longitud de tubos germinativos y formación de apresorios en conidias de diferentes especies de *Colletotrichum*. a, b y c diferentes largos de tubos germinativos. d, e, f y g formación de apresorios en tubos con diferente longitud.



Apéndice 7. Desarrollo de apresorios en una superficie hidrófoba de poliestireno. La figura es el resultado de la selección de conidias representativas de las diferentes especies de *Colletotrichum*, en donde se aprecia el desarrollo del tubo germinativo y el apresorio. a) ensanchamiento del tubo germinativo, comienzo de la diferenciación del apresorio (entre 2 y 4 horas). b) apresorio formado, en donde se observa el oscurecimiento de la estructura, asociado a la acumulación de melanina (8, 16 y 24 horas) y c) apresorio completamente melanizado.

Apéndice 8. Porcentaje de germinación (G) y formación de apresorios (A), en el tiempo, en una superficie de poliestireno, de las diferentes especies de *Colletotrichum*. Porcentajes con diferentes letras en sentido vertical presentan diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Tiempo (h)	Porcentajes											
	<i>C. cigarro</i>		<i>C. pyricola</i>		<i>C. gloeosporioides</i>		<i>C. sp.</i>		<i>C. fructicola</i>		<i>C. beeveri</i>	
	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A
2	1,0e	0,0d	0,3d	0,2d	0,3e	0,0d	0,5d	0,3c	1,0d	1,0c	0,7e	0,0c
4	27,5d	2,0d	35,2c	0,2d	27,8d	1,2d	21,7c	0,3c	31,0c	4,0c	11,7d	0,3c
8	40,7c	32,5c	44,7c	11,7c	32,0c	11,8c	24,0c	20,7b	31,0c	21,0b	27,3c	3,7c
16	55,2b	39,7b	68,0b	42,8b	72,8b	59,0b	51,8b	24,8b	44,0b	31,7b	45,7b	14,7b
24	91,2a	79,0a	80,8a	73,0a	84,7a	74,5a	70,7a	57,0a	80,3a	60,3a	81,2a	46,0a

Apéndice 9. Porcentaje de germinación (G) y formación de apresorios (A), en el tiempo, en hojas de palto, de las diferentes especies de *Colletotrichum*. Porcentajes con diferentes letras en sentido vertical presentan diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Tiempo (h)	Porcentajes											
	<i>C. cigarro</i>		<i>C. pyricola</i>		<i>C. gloeosporioides</i>		<i>C. sp.</i>		<i>C. fructicola</i>		<i>C. beeveri</i>	
	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	A
2	0,8e	0,4e	0,1d	0,3e	0,7d	0,1d	0,2e	0,0e	0,0e	0,0d	0,1d	0,7e
4	14,8d	3,2d	10,6c	4,2d	14,3c	1,2d	8,9d	2,5d	0,8d	0,0d	1,4d	3,2d
8	19,1c	10,1c	29,7b	9,7c	33,4b	8,1c	16,0c	4,9c	7,3c	3,2c	6,4c	10,1c
16	81,8b	35,8b	82,3a	33,0b	77,0a	24,6b	83,0b	22,0b	26,1b	20,8b	25,8b	11,9b
24	97,6a	88,9a	82,4a	89,1a	81,1a	66,4a	93,1a	63,8a	56,0a	55,7a	55,3a	57,1a

Apéndice 10. Porcentaje de germinación sobre superficies de poliestireno (GP) y sobre hojas de palto (GH), de las diferentes especies de *Colletotrichum*. Porcentajes con diferentes letras en sentido vertical presentan diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Tiempo (h)	Porcentaje											
	<i>C. cigarro</i>		<i>C. pyrricola</i>		<i>C. gloeosporioides</i>		<i>C. sp.</i>		<i>C. fructicola</i>		<i>C. beeveri</i>	
	GP	GH	GP	GH	GP	GH	GP	GH	GP	GH	GP	GH
2	1,0e	0,8e	0,3d	0,1d	0,3e	0,7d	0,5d	0,2e	1,0d	0,0e	0,7e	0,1d
4	27,5d	14,8d	35,2c	10,6c	27,8d	14,3c	21,7c	8,9d	31,0c	0,8d	11,7d	1,4d
8	40,7c	19,1c	44,7c	29,7b	32,0c	33,4b	24,0c	16,0c	31,0c	7,3c	27,4c	6,4c
16	55,2b	81,8b	68,0b	82,3a	72,8b	77,0a	51,8b	83,0b	44,0b	26,1b	45,7b	25,8b
24	91,2a	97,6a	80,8a	82,4a	84,7a	81,1a	70,2a	93,1a	80,3a	56,0a	81,2a	55,3a

Apéndice 11. Porcentaje de formación de apresorios sobre superficies de poliestireno (AP) y sobre hojas (AH) de palto, de las diferentes especies de *Colletotrichum*. Porcentajes con diferentes letras en sentido vertical presentan diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD de Fisher ($p < 0,05$).

Tiempo (h)	Porcentaje											
	<i>C. cigarro</i>		<i>C. pyrricola</i>		<i>C. gloeosporioides</i>		<i>C. sp.</i>		<i>C. fructicola</i>		<i>C. beeveri</i>	
	GP	GH	GP	GH	GP	GH	GP	GH	GP	GH	GP	GH
2	0,0d	0,4e	0,2d	0,3e	0,0d	0,1d	0,3c	0,0e	1,0c	0,0d	0,0c	0,7e
4	2,0d	3,2d	0,2d	4,2d	1,2d	1,2d	0,3c	2,5d	4,0c	0,0d	0,3c	3,2d
8	32,5c	10,1c	11,7c	9,7c	11,8c	8,1c	20,7b	4,5c	21,0b	3,2c	3,7c	10,1c
16	39,7b	35,8b	42,8b	33,0b	59,0b	24,6b	24,8b	22,0b	31,7b	20,8b	14,7b	11,9b
24	79,0a	88,9a	73,0a	89,1a	74,5a	66,4a	57,0a	63,8a	60,3a	55,7a	46,0a	57,1a